

SÉRIE A, N° 1575

N° D'ORDRE : 2441

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

YVES COLIN

PHARMACIEN CAPITAINE

1^{re} THÈSE. — RECHERCHES TECHNIQUES SUR LA SÉPARATION ET LE DOSAGE
DES PRINCIPES IMMÉDIATS PHOSPHORÉS DES GRAINES.
VARIATION DE CES COMPOSÉS AU COURS DE LA MATURA-
TION ET DE LA GERMINATION.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

94
Soutenues le 4 juin 1935 devant la Commission d'Examen.

MM. JAVILLIER *Président.*
COMBES } *Examineurs.*
LAUGIER }

PARIS

IMPRIMERIE A. MARETHEUX ET L. PACTAT

1, RUE CASSETTE, 1

1935

SÉRIE A, N° 1575

N° D'ORDRE : 2441

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

YVES COLIN

PHARMACIEN CAPITAINE

1^{re} THÈSE. — RECHERCHES TECHNIQUES SUR LA SÉPARATION ET LE DOSAGE
DES PRINCIPES IMMÉDIATS PHOSPHORÉS DES GRAINES.
VARIATION DE CES COMPOSÉS AU COURS DE LA MATURE-
TION ET DE LA GERMINATION.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 4 juin 1935 devant la Commission d'Examen.

MM. JAVILLIER . . .	<i>Président.</i>
COMBES	} <i>Examineurs.</i>
LAUGIER	

PARIS

IMPRIMERIE A. MARETHEUX ET L. PACTAT

1, RUE CASSETTE, 1

1935

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

MM.

Doyen honoraire. . . . M. MOLLIARD.

Doyen. C. MAURAIN, *Professeur*, Physique du Globe.

<i>Professeurs honoraires.</i>	(H. LE CHATELIER.	Léon BRILLOUIN.	AUGER.
	H. LEBESQUE.	GOURSAT.	BLAISE.
	A. FERNBACH.	WALLERANT.	DANGREARD.
	A. LEDUC.	GUILLET.	JANET.
	Émile PICARD.	PECHARD.	LESPIEAU.
	Rémy PERRIER.	FREUNDLER.	MARCHIS.
			MOUTON.

PROFESSEURS

G. BERTRAND.	T	Chimie biologique.	A. DEBIERNE	T	Radioactivité.
M. CAULLERY.	T	Zoologie (Évolution des êtres organisés).	A. DUFOUR.	T	Physique (P. C. B.).
G. URBAIN.	T	Chimie générale.	L. DUNOYER		Optique appliquée.
Émile BOREL.	T	Calcul des probabilités et Physique mathém.	A. GUILLIERMOND	T	Botanique (P. C. B.).
Jean PERRIN.	T	Chimie physique.	M. JAVILLIER.		Chimie biologique.
H. ABRAHAM.	T	Physique.	L. JOLEAUD		Paléontologie.
E. CARTAN.	T	Géométrie supérieure.	ROBERT-LÉVY.		Zoologie.
M. MOLLIARD	T	Physiologie végétale.	F. PICARD		Zoologie (Évolution des êtres organisés).
L. LAPICQUE	T	Physiologie générale.	Henri VILLAT	T	Mécanique des fluides et applications.
E. VESSIOT	T	Mécanique analytique et Mécanique céleste.	Ch. JACOB	T	Géologie.
A. COTTON.	T	Recherches physiques.	P. PASCAL	T	Chimie minérale.
J. DRACH	T	Analyse supérieure et Algèbre supérieure.	M. FRÉCHET	T	Calcul des Probabilités et Physique mathématique.
Charles FABRY.	T	Enseignement de Physique.	E. ESCLANGON	T	Astronomie.
Charles PÉREZ.	T	Zoologie.	M ^{me} RAMART-LUCAS.	T	Chimie organique.
Léon BERTRAND	T	Géologie structurale et géologie appliquée.	H. BÉGHIN.	T	Mécanique physique et expérimentale.
P. PORTIER.	T	Physiologie comparée.	FOCH		Mécanique expérimentale des fluides.
E. RABAUD.	T	Biologie expérimentale.	PAUTHENIER		Physique (P. C. B.).
M. GUICHARD.		Chimie minérale.	De BROGLIE	T	Théories physiques.
Paul MONTEL.	T	Théorie des fonctions et Théorie des transformations.	CHRÉTIEN		Optique appliquée.
P. WINTREBERT.	T	Anatomie et histologie comparées.	P. JOB.		Chimie générale.
L. BLARINGHEM.	T	Botanique.	LABROUSTE.		Physique du Globe.
O. DUBOSQ	T	Biologie maritime.	PRENANT.		Zoologie.
G. JULIA.	T	Application de l'analyse à la géométrie.	VILLEY		Mécanique physique et expérimentale.
C. MAUGUIN	T	Minéralogie.	BOHN		Zoologie (P. C. B.).
A. MICHEL-LÉVY		Pétrographie.	COMBES		Botanique.
H. BÉNARD.	T	Mécanique expérimentale des fluides.	GARNIER.		Calcul différentiel.
A. DENJOY.	T	Calcul différentiel et calcul intégral.	PÈRES.		Mécanique des fluides.
L. LUTAUD.	T	Géographie physique et géologie dynamique.	HACKSPILL.		Chimie (P. C. B.).
Eugène BLOCH.	T	Physique théorique et physique céleste.	LAUGIER.		Physiologie générale.
G. BRUHAT.		Physique.	TOUSSAINT.		Technique aéronautique.
E. DARMOIS		Physique.	M. CURIE		Physique (P. C. B.).
			G. RIBAUD.	T	Hautes températures.
			CHAZY.	T	Mécanique rationnelle.
			GAULT.		Chimie (P. C. B.).
			CROZE.		Physique.
			DUPONT	T	Théories chimiques.
			LANQUINE		Géologie.
			VALIRON.		Mathématiques.

Secrétaire. A. PACAUD.
Secrétaire honoraire. D. TOMBECK.



A MES PARENTS

A MA FIANCÉE

A MES AMIS

A M. LE PROFESSEUR M. JAVILLIER

PROFESSEUR S. C. A LA FACULTÉ DES SCIENCES
PROFESSEUR AU CONSERVATOIRE NATIONAL DES ARTS-ET-MÉTIERS
CHEVALIER DE LA LÉGION D'HONNEUR

*Avec l'expression de ma reconnaissance
et de mon profond respect.*

AVANT-PROPOS

L'idée de ce travail nous a été donnée alors que nous terminions nos études pharmaceutiques, par M. LEULIER, professeur de pharmacie chimique et pharmacologie à la Faculté de Lyon. Séduit par les résultats qu'avait obtenus M. JAVILLIER dans l'étude des rapports phosphorés des tissus animaux, il nous proposait de voir jusqu'à quel point les techniques nouvelles étaient applicables dans le domaine de la chimie végétale. Il pensait que le laboratoire du professeur BARRAL, où je m'étais initié aux disciplines de la chimie analytique pendant mes quatre années de scolarité, serait favorable à l'éclosion d'un tel travail.

Le hasard d'une mutation militaire ne nous permit pas de continuer à travailler sous la direction de Maîtres dont nous avions déjà pu apprécier la science et la grande bonté.

Nommé pharmacien aide-major à l'Hôpital militaire SÉDILLOT à Nancy, nous eûmes la bonne fortune de trouver en M. le professeur PASTUREAU, l'ancien qui ne demandait qu'à encourager les projets de son jeune camarade. Il nous ouvrit toutes grandes les portes de son laboratoire de la Faculté de Pharmacie. Nous regrettons que le travail absorbant de l'hôpital ne nous ait pas permis d'en profiter davantage.

Un fait saillant de cette période de travail dont nous parlons ici dans notre avant-propos, car nous n'avons pu en renouveler l'observation par la suite, a été la formation, au cours d'une stabilisation par l'alcool à 95° de lentilles germées, d'une petite quantité d'un produit cristallisé. Nous n'avons pu en

recueillir suffisamment pour faire une étude chimique complète. Du moins avons-nous pu caractériser dans sa molécule : le carbone (ce corps chauffé sur une lame de platine brûlait), l'azote (chauffage avec du sodium, formation de cyanure), le phosphore (formation de phosphate ammoniaco-magnésien après minéralisation). Traité par l'orcine chlorhydrique, il donnait la réaction bleu violacée des pentoses.

Ces constatations, malgré leur caractère incomplet, nous incitent à penser que nous nous trouvions en présence d'un de ces corps que nous reproduisons dans nos laboratoires par hydrolyse des acides nucléiques : les nucléotides.

Le but de notre travail n'était d'ailleurs pas d'étudier par l'analyse immédiate les principes phosphorés des plantes, mais, comme nous l'avons dit plus haut, d'appliquer à la chimie végétale les méthodes de séparation et de dosage déjà utilisées pour les tissus animaux. Bien vite, nous nous sommes rendu compte qu'il ne suffisait pas d'une simple adaptation des techniques, mais d'une étude nouvelle à poursuivre.

Aussi, comme notre année de stage à Nancy se terminait et que nous étions appelé à suivre les cours de l'École d'application du Val-de-Grâce, M. PASTUREAU nous envoya à M. JAVILLIER qui, à ce moment, poursuivait ses recherches au laboratoire de chimie de l'Institut d'hygiène alimentaire. Malgré une place déjà bien restreinte, M. JAVILLIER accepta d'admettre un élève de plus. Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre bien vive reconnaissance pour les conseils éclairés et dévoués qu'il a bien voulu nous donner constamment dans l'exécution de ce travail.

C'est dans son laboratoire que ce travail prit corps. A notre arrivée en 1928, la technique d'extraction du phosphore lipidique des tissus animaux avait été mise au point et nous eûmes tôt fait de la voir s'appliquer aux graines.

Par contre, la technique d'extraction du phosphore nucléique des tissus animaux ne donnait pas encore complète satisfaction, aussi avons-nous d'abord essayé d'extraire les autres composés phosphorés non lipidiques au moyen de l'acide chlorhy-

drique dilué. Le phosphore restant dans la poudre après cette extraction acide devait être considéré comme phosphore nucléique.

Cette méthode utilisée par les différents expérimentateurs avant nous ne nous paraissait pas à l'abri de critiques, elle n'était d'ailleurs qu'un moyen tout à fait indirect d'appréciation du phosphore nucléique. En fait, elle ne donna pas les résultats attendus; aussi nous vîmes avec grande satisfaction se préciser au laboratoire la méthode d'extraction du phosphore nucléique des tissus animaux délipidés, secs et finement pulvérisés, par la solution de chlorure de sodium additionnée de triacétide (M. JAVILLIER et H. ALLAIRE).

Cette technique ne parut d'ailleurs pas s'appliquer aux graines et ce n'est qu'après une étude systématique de toutes les conditions de précipitation que nous pûmes nous rendre compte que le facteur principal influençant la précipitation était la *réaction du milieu*. Ceci établi, la méthode put s'appliquer par la suite aux trois cas envisagés.

En même temps que le phosphore nucléique passait en solution chlorurée sodique, les autres composés phosphorés (phytine et phosphates minéraux) passaient presque intégralement en solution dans le cas du germe du blé et de la poudre de lentilles. C'est dans cette solution que nous avons étudié les conditions de précipitation de la *phytine* par le chlorure ferrique en milieu acide.

Dans le cas d'une graine oléagineuse, le tournesol, la solubilité de ces composés phosphorés dans la solution de chlorure de sodium étant très loin d'être totale, nous avons dû étudier concurremment avec la méthode d'extraction chlorurée du phosphore nucléique une méthode d'extraction et de précipitation de la phytine en milieu trichloracétique.

Cette partie analytique mise au point, nous l'avons appliquée à l'étude de la germination de la lentille et à celle de la maturation de la graine du tournesol.

Avant d'exposer le plan de notre travail, qu'il nous soit permis de remercier M. le professeur CHARPY, qui voulut bien

nous réserver un si bon accueil dans son laboratoire vers la fin de notre séjour à l'infirmerie de l'École Polytechnique.

Nous remercions également nos différents médecins chefs : M. le médecin général PRAT, M. le médecin lieutenant-colonel BRIZON, M. le médecin colonel MAISONNET qui successivement nous prodiguèrent leurs encouragements et nous facilitèrent le travail.

Nous sommes très reconnaissants à MM. les Professeurs COMBES et LAUGIER, qui ont bien voulu siéger dans notre Jury de Thèse, de l'amical accueil qu'ils nous ont réservé.

PLAN

CHAPITRE I. — Les principes immédiats phosphorés dans les graines.

- a) Etude des phospholipides, leur évolution au cours de la germination.
- b) Etude des protéides phosphorés : les *nucléoprotéides*, leur constitution, leur isolement, les méthodes de dosage; les *phosphoprotéides*.
- c) Etude de la phytine. Sa préparation, ses propriétés, autres esters de l'inosite : l'inosite.
Répartition de la phytine dans les parties végétatives de la plante, dans la graine. Son évolution au cours de la germination.
- d) Etude du phosphore minéral : son dosage.

CHAPITRE II. — Techniques d'extraction et de dosage de ces composés phosphorés.

- a) Extraction des lipides totaux. Séparation. Destruction sulfo-nitrique.
Dosage du phosphore par la méthode de COPAUX.
- b) Extraction et dosage des autres composés phosphorés.
 - 1° Les extractions par les acides dilués.
 - 2° Les extractions par la solution de chlorure de sodium + triacétide.
 - A. Extraction du phosphore nucléique du germe de blé.
 - B. Extraction du phosphore nucléique de la graine de lentilles.
- c) Extraction et dosage des autres composés phosphorés. La phytine; étude de sa précipitation.
- d) Extraction et dosage des autres composés phosphorés. Le phosphore minéral, séparation, dosage.

CHAPITRE III. — Résultats obtenus dans l'application de ces méthodes à l'extraction des composés phosphorés du germe de blé, de la poudre de graines de lentilles, de la graine de tournesol.

- a) Cas du germe de blé et de la poudre de lentilles : extraction chlorurée sodique.

- b) Extraction d'un nouveau germe de blé par l'acide trichloracétique à 40 p. 100.
- c) Cas de la graine de tournesol.

CHAPITRE IV. — Evolution des composés phosphorés au cours de la germination de la lentille. Préambule.

- a) Première germination : Etude de la variation des lipides totaux et du phosphore lipidique au cours de la germination sur eau distillée à la lumière et à l'obscurité.
- b) Deuxième germination : Etude de la variation des différentes formes de phosphore au cours de la germination à la lumière et à l'obscurité.
- c) Troisième germination : Confirmation des résultats précédents dans une germination à la lumière.

CHAPITRE V. — Formation des composés phosphorés au cours de la maturation de la graine de tournesol.

Etude de la variation des différentes formes de phosphore à trois stades de maturation de la graine.

CHAPITRE VI. — Conclusions.

CHAPITRE PREMIER

LES PRINCIPES IMMÉDIATS PHOSPHORÉS DANS LES GRAINES

Les principes immédiats phosphorés rencontrés jusqu'ici dans les graines et d'ailleurs d'une façon générale chez les végétaux se laissent facilement classer dans quatre grands groupes :

1° « Lipides complexes » ou « phosphatides » ou « phospholipides » au sens large, dont les lécithines (ou lécithides) sont les représentants les plus qualifiés (¹).

2° « Hétéroprotéides » comprenant comme protéides phosphorés les phospho-protéides et les nucléo-protéides.

3° Composés du groupe phytinique, dont la phytine de **POSTERNAK** est le type.

4° Phosphates minéraux.

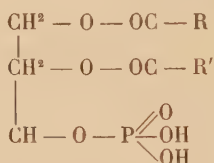
I. — *Les phospho-lipides.*

Nous entendons par *phospho-lipides* les composés phosphorés contenus dans l'extrait lipidique des tissus, extrait qui contient d'ailleurs en plus des phospho-lipides : des *glycérides* ou esters du glycérol, des *cérides*, ou esters d'alcools de poids moléculaires élevés, des *stérides* ou esters d'alcools polycycliques, ces trois derniers groupes de principes immédiats étant des lipides ternaires ne contenant pas de phosphore.

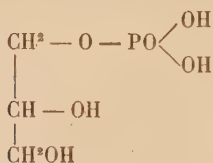
1. Dans la nomenclature internationale encore en voie d'élaboration, les lipides se diviseraient conformément aux décisions prises à la conférence de La Haye (1928) en lipides ternaires (ne renfermant que C. H. O.) et lipides complexes renfermant en outre, du P ou du P et de l'N. Les lipides complexes renfermant C. H. O. P. seraient appelés phospho-lipides, ceux qui renferment C. H. O. P. N. seraient appelés phospho-amino-lipides.

Les phospho-lipides se divisent comme nous l'avons déjà mentionné dans la note ⁽¹⁾ [page 7] en *phospho-lipides* proprement dits et en *phospho-amino-lipides*. Les uns et les autres sont des esters phosphoriques.

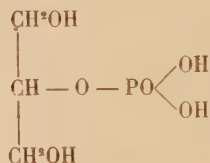
Les *phospho-lipides* proprement dits sont d'abord représentés par des lécithines dont le groupement azoté a disparu. Ainsi l'on a décrit l'acide phosphatidique extrait des feuilles de choux et d'épinards, dont la formule est la suivante :



Mais l'on peut envisager que les représentants principaux de ce groupe sont les acides glycéro-phosphoriques :



Acide glycérphosphorique α .



Acide glycérphosphorique β .

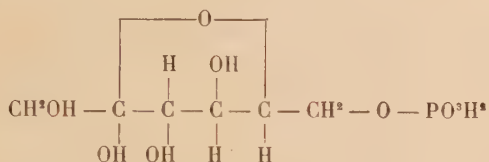
Ils pourraient provenir de l'hydrolyse des lécithines si répandues dans le règne végétal comme dans le règne animal. Cependant, l'on n'a pas encore réussi à caractériser ces acides dans les plantes, pas plus que leurs sels, les glycérphosphates. On sait toutefois qu'il existe des diastases hydrolysant les glycérphosphates : les glycérphosphatases.

D'autres phospho-lipides sont constitués par des esters phosphoriques de sucres; les mieux connus sont ceux qui ont été rencontrés dans la dégradation des matières sucrées au cours de la fermentation alcoolique par la levure elle-même ou par la zymase de levure.

On connaît ainsi : l'ester *hexose diphosphorique* de HARDEN ⁽¹⁾ et YOUNG (1908-1911) trouvé dans la fermentation des sucres

1. On trouvera dans la bibliographie les références par ordre alphabétique de noms d'auteurs; nous indiquons dans le texte la date de parution du travail avec un indice donnant l'ordre de mention dans l'index.

par la levure basse fraîche en présence de toluène; l'ester *monophosphorique* de NEUBERG (1918) obtenu par hydrolyse ménagée du précédent, celui de ROBISON (1922) que l'on trouve en petite quantité à côté de l'ester de HARDEN et YOUNG dans les produits de réaction :



(Ester fructose monophosphorique.)

Dans les plantes supérieures, BARRENSCHEEN et ALBERS (1928), BARRENSCHEEN et PANY (1930) ont trouvé également l'hexose-monophosphate dans l'*Elodea canadensis* Rich, dans les grains de froment et de seigle, mais ils n'ont pu déceler de diphosphate.

COCKEFAIR (1931) a confirmé ces résultats dans le jus de tomate, la pomme de terre, le sureau par la méthode de ROBISON.

Des esters *polyose-monophosphoriques* constitueraient aussi selon POSTERNAK (1933) l'amylose et l'amylopectine.

Nous pourrions placer ici un autre ester phosphorique d'un polyalcool cyclique : l'ester hexaphosphorique de l'inosite dont le sel calcique et magnésien constitue la *phytine*. En raison de sa constitution ce serait tout à fait légitime, mais en raison de sa liaison, dans les matières premières que nous voulons étudier, avec des bases, et des circonstances de son extraction, nous en parlerons plus loin dans un chapitre spécial.

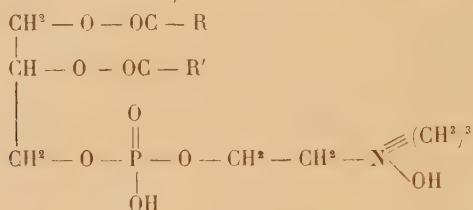
Les représentants les plus importants des lipides complexes ou phosphatides sont toutefois les *phospho-amino-lipides*, parmi lesquels il y a lieu de distinguer : a) des glycéro-phospho-amino-lipides ; b) des glucido-phospho-amino-lipides.

Dans les premiers, l'alcool estérifié est le glycérol, dans les seconds, la substance à fonction estérifiable par l'acide phosphorique est du groupe des sucres.

Les plus importants des glycéro-phospho-amino-lipides sont

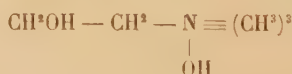
les *lécithines* ⁽¹⁾ dont il est facile de prévoir qu'elles peuvent exister sous plusieurs formes isomériques. La lécithine oléopalmitique compte 9 isomères : 6 dérivant de l'acide α -glycérophosphorique, 3 de l'acide β -glycérophosphorique.

Voici, à titre d'exemple, la formule d'un lécithide :



Ces lécithides sont très répandus chez les légumineuses, dont les graines en renferment de 0,74 à 1,64 % : l'industrie en extrait de grandes quantités de la graine de soja. Les graines des céréales, les semences de Conifères en renferment de 0,25 à 0,74 % (SCHULZE, 1908). Tout récemment, ÉCHEVIN (1931) a mis en évidence et a dosé les lécithines dans les feuilles vertes de plusieurs espèces ; il n'en a pas trouvé dans les feuilles sèches.

Les lécithines végétales ont été étudiées par LEVENE (1921, 1925, 1926, 1924-1925) et ses élèves aux États-Unis et, d'autre part, par GRAFE et HORVAT (1925) et MAGISTRIS (1925, 1926, 1, 2, 3), et KORETOSHI OSE (1927) en Allemagne. Ces auteurs ont montré qu'elles avaient le même schéma que les lécithines animales. Par hydrolyse, elles donnent naissance aux mêmes produits : glycérol, acides gras, acide phosphorique, bases azotées. Ces dernières sont la choline :



ou l'aminoéthanol :



dérivant respectivement des lécithides et des céphalides.

1. L'on dit indifféremment lécithine ou lécithide, le terme ancien de lécithine est défendable, puisque ces corps renferment de l'azote basique; le terme lécithide est en accord avec la désinence adoptée.

Il n'y a pas de sphingophosphatides dans le règne végétal.

L'on dit habituellement que les lécithines végétales diffèrent des lécithines animales par leur teneur en phosphore. Pour une lécithine oléo-palmitique, cette teneur en phosphore est théoriquement de 3,99 $\%$. Or, dans les lécithines extraites des végétaux, le pourcentage en phosphore est souvent inférieur à 2 $\%$. NOTTBOHM et MAYER (1932) indiquent 1,96 et 2,70 pour la lécithine de fèves de soja. La différence entre ces résultats et les valeurs théoriques provient de la difficulté qu'on éprouve à isoler les lécithines végétales à un degré suffisant de pureté.

Comme les lécithines animales, les lécithines végétales forment des complexes en particulier avec les matières protéiques, mais aussi avec des sels, avec des sucres et des polysaccharides. Si ce ne sont pas là de véritables combinaisons, ce sont tout au moins des produits d'adsorption possédant une grande stabilité. Pour GRAFE et MAGISTRIS (1926), les lécithines formeraient avec les albumines une membrane lécithoprotéique autour de la cellule.

Les phosphatides végétaux, comme l'ont montré GRAFE et KORETOSHI OSE (1927), BLEYER et DIEMAIR (1931) sont dialysables et donnent, hors des organes, des pseudo-solutions. On voit comment ils peuvent passer dans le sol ou dans le milieu où vit la plante. Peut-être jouent-ils un rôle important dans les échanges nutritifs entre les cellules et le milieu extérieur.

LES PHOSPHO-LIPIDES AU COURS DE LA GERMINATION.

HISTORIQUE. — De nombreux physiologistes ont déjà étudié la variation de ces principes immédiats phosphorés au cours de la germination. Les uns pesaient l'extrait éthéré total obtenu comme il suit : une première extraction des graines par l'alcool était suivie d'une distillation, d'une dessiccation du résidu et d'une reprise de ce dernier par l'éther sec. L'évaporation de ce dernier constituait l'extrait éthéré total. Les autres auteurs, après pesée de cet extrait et minéralisation, y dosaient le phosphore. Celui-ci représentait le phosphore lipodique.

C'est ainsi que MAXWELL, dès 1891, expérimentant sur des

graines de *Phaseolus*, de *Gossypium* et de *Zea Mays*, montre que, dans les premiers stades de la germination, le taux de l'extrait éthéré augmente d'abord à la lumière, puis diminue,

MERLIS (1897) signale pareillement que la teneur en huile du lupin passe de 7,4 % à 1,6 % au bout de quinze jours de germination.

LECLERC DU SABLON (1893, 1894, 1897) fait les mêmes observations sur le ricin et le soja. Il montre que l'huile digérée peu à peu au cours de la germination des amandes libère une certaine quantité d'acides gras.

Vers la même époque, MAQUENNE (1898) établit que ces acides gras se transforment en sucre. Les acides gras saturés paraissent moins aptes à cette transformation que les acides gras non saturés tels que l'acide oléique. Pour MAQUENNE, les acides gras saturés interviendraient surtout dans le phénomène respiratoire.

MILLER (1910), faisant germer des graines d'*Helianthus* à la lumière mais en l'absence de gaz carbonique, montrait que les réserves lipidiques tombaient de 55,6 % à 13,5 % au bout de treize jours.

Les auteurs précédents et bien d'autres qu'on trouvera mentionnés dans la mise au point de TERROINE (1920), étudiaient les variations des lipides par pesée de l'extrait éthéré total.

Tout récemment, KIA-WO-HOU (1933) faisant agir les lipoxydases de la graine de soja sur les lipides a montré que le passage des lipides aux glucides avait pour termes intermédiaires des acides-alcools qui se formaient aux dépens des acides gras non saturés (linoléiques).

Les auteurs suivants ont considéré surtout les phospho-aminolipides qu'ils déterminaient en dosant le phosphore de l'extrait éthéré précédent.

C'est ainsi qu'IWANOW (1902), étudiant *Vicia sativa* L. à l'obscurité, observait une chute du phosphore lipidique qui passait de 11,6 % du phosphore total au début de la germination à 6,6 au bout de vingt jours. Les phospho-lipides avaient donc diminué de moitié pendant que les protéines tombaient de 52,5 à 13,7 %.

REYNOLDS GREEN et JACKSON (1906) expérimentant sur la graine de Ricin, assistaient au contraire à une augmentation du

phosphore lipidique qui demeurerait par la suite relativement constant.

BERNARDINI et MORELLI (1912), faisant germer du froment à la lumière, voyaient le phosphore phosphatidique passer de 49 milligr. à 55 milligr. pour 500 graines, tandis qu'à l'obscurité, il disparaissait complètement au bout de quelques jours.

ZLATAROFF (1916), qui étudiait les variations du phosphore lipidique dans les cotylédons et les plantules de *Cicer arietinum* L., le voyait diminuer dans les cotylédons et croître dans les plantules.

Tout récemment, HÉE et BAYLE (1932), étudiant le lupin blanc, ont vu les composés phosphorés lipidiques baisser au cours de la germination à la lumière et à l'obscurité. La diminution étant moins accentuée à la lumière, les auteurs ont supposé une synthèse de ces composés à la lumière.

Pareillement, MANCEAU (P.), REVOL (L.) et CHARMILLON (R.) [1932], faisant germer des graines de marron d'Inde sur terre arable, ont conclu à l'influence favorable de la lumière sur la formation des phospholipides.

En résumé, les phospho-aminolipides des graines semblent être utilisés en partie au moment de la germination.

Tandis que le végétal les utilise, il en élabore en même temps une certaine quantité, du moins en présence de lumière.

II. — *Les nucléo-protéides.*

Les nucléo-protéides sont considérés à juste titre comme des constituants parmi les plus importants de la cellule végétale et animale.

Ce sont les substances fondamentales du noyau, en particulier de la chromatine. Selon certains cytologistes, la coloration du noyau par un colorant basique ne serait qu'une double décomposition entre les nucléo-protéides nucléaires et les sels colorants. Les chromatines colorées des préparations histologiques ne seraient ainsi que des nucléates basiques insolubles.

Dans la réaction de FEULGEN et ROSSENBECK (1924) consistant en une hydrolyse modérée de l'acide nucléique par de l'acide chlorhydrique étendu, les groupements aldéhydiques rédu-

teurs libérés coloreraient le réactif de SCHIFF. Cette réaction permettrait donc de mettre en évidence les composés nucléiques des cellules végétales.

ALEXEIEFF (1916, 1923) a constaté d'ailleurs que les corpuscules métachromatiques du *Bacillus mitochondrialis* ingéré par le *Cercomonas fusiformis* résistent jusqu'à la destruction du bacille et se retrouvent ensuite dans la vacuole digestive qui les expulse au dehors. Cette résistance lui fait admettre que ces corps sont constitués par des nucléo-protéides qui ne seraient pas digérés par le *Cercomonas*.

VAN HERWERDEN (1914) en traitant divers champignons par une nucléase obtient la disparition de la métachromatine et en conclut à la nature de composé nucléique de cette substance.

C'est HOPPE-SEYLER qui signala le premier les nucléo-protéides des végétaux en 1871, à la suite du premier mémoire de MIESCHER sur les nucléo-protéides des cellules du pus. Il utilisait la même technique que cet auteur et les extrayait de la levure de bière.

Les travaux relatifs à la constitution de ces corps ont surtout été entrepris par KOSSEL qui publia de 1879 à 1903 une longue série d'importants travaux dans *Z. f. physiol. Chem.* et dans *Arch. f. Anat. u. Physiol.* et par LEVENE et ses collaborateurs : BASS, JACOBS, LA FORGE, MEDIGRECEANU, SIMMS, SOBOTKA, PERKINS, etc., qui, de 1903 à 1905, publièrent leurs recherches dans *Z. f. physiol. Chem.*, puis dans *Ber. d. Bioch. Z.*, enfin, depuis 1914 dans *J. Biol. Chem.*

Grâce à ces travaux, la constitution des acides nucléiques paraît bien assise en ce qui concerne tout au moins un acide nucléique végétal : celui de la levure de bière.

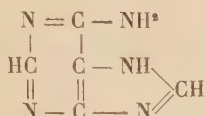
Nous allons passer en revue les produits d'hydrolyse, puis nous verrons comment ces différents éléments constitutants s'assemblent dans la molécule. Enfin, nous étudierons les différents modes d'extraction et de dosage de ces corps.

HYDROLYSE DES ACIDES NUCLÉIQUES. — Les acides nucléiques libèrent par hydrolyse totale :

- 1° De l'acide phosphorique.
- 2° Des bases puriques et pyrimidiques.
- 3° Une matière sucrée.

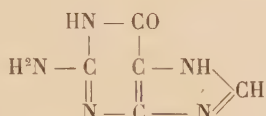
1° L'acide phosphorique libéré est de l'acide orthophosphorique, ce qui n'impliquerait pas nécessairement qu'il soit sous cette forme dans la molécule de l'acide nucléique.

2° Les bases sont, pour les bases puriques : l'adénine $C^5H^5N^5$ qui est la 6-amino-purine :

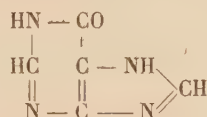
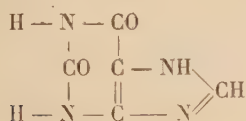


que KOSSEL reconnut dès 1880 dans les produits d'hydrolyse de l'acide nucléique de la levure.

Peu après, d'ailleurs, il isolait la *guanine* $C^5H^5N^5O$ qui est la 2-amino-6-oxypurine.

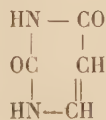
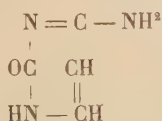


La *xanthine* ou 2-6-dioxypurine et l'*hypoxanthine* ou 6-oxypurine :



qui se rencontrent aussi dans les produits d'hydrolyse ne sont que des produits secondaires résultant de l'hydratation avec libération d'ammoniaque de la guanine et de l'adénine,

Les bases pyrimidiques sont : la *cytosine* $C^4H^4N^3O$, qui est la 6-amino-2-oxypyrimidine et l'*uracile* $C^4H^4N^2O^2$, qui est la 2-6-dioxypyrimidine.

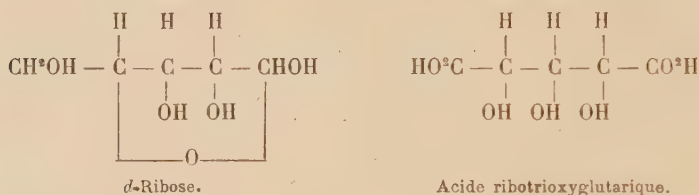


L'uracile a été isolé des produits d'hydrolyse de la levure dès 1900 par ASCOLI, jeune étudiant au laboratoire d'ALBERT KOSSEL. En 1908, RIELANDER l'isolait de l'ergot de seigle.

LEVENE, en 1909, montrait que ces deux bases se trouvent

en quantité équimoléculaire dans les produits d'hydrolyse de la levure et que l'uracile et la cytosine sont des produits primaires de l'hydrolyse.

3° *La matière sucrée* que l'on retire du liquide obtenu dans l'hydrolyse à chaud par l'acide sulfurique à 2 % et que l'on obtient bien cristallisée est un pentose dont le point de fusion est 87°; le pouvoir rotatoire $\alpha_D = -19.5$. Elle donne une benzylphénylhydrazone fondant à 128°; une phénylosazone fondant à 163° et une parabromophénylosazone fondant à 180°-185°, ces deux dernières étant identiques à celles du *d*-arabino-se. Par oxydation, on obtient un acide trioxyglutarique inactif. Ce pentose a été identifié par LEVENE et JACOBS avec le *d*-ribose.

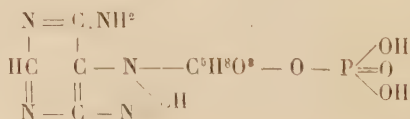


C'est là une notion fort importante qui fait pénétrer le ribose parmi les principes sucrés fondamentaux de la chimie végétale. Il correspond à l'adonite, seule pentite existant à l'état naturel.

*
*
*

Voyons comment s'associent dans la molécule des acides nucléiques les fragments de leur hydrolyse totale. Pour s'en rendre compte, il suffit d'opérer une hydrolyse plus ménagée qui, au lieu d'aller jusqu'aux bases, jusqu'à l'acide phosphorique et au sucre, conserve une base liée à la matière sucrée, elle-même estérifiée par l'acide phosphorique.

Une hydrolyse faite par de l'ammoniaque à 2.5 % par exemple pendant une heure et demie à 100°, ou par des extraits d'organes libérera des nucléotides. C'est ainsi que LEVENE (1918) a pu isoler l'acide adénylique de la levure :



où une molécule d'acide phosphorique, une molécule de pentose et une molécule d'adénine sont soudées.

Les acides nucléiques résultent ainsi de l'association de quatre molécules d'acide phosphorique, quatre molécules de sucre et quatre bases dont deux du groupe de la pyridine et deux du groupe de la pyrimidine.

Les corps constitués sur le schéma : acide phosphorique-sucre-base, sont des *nucléotides* comme nous l'avons dit plus haut. L'acide adénylique est un nucléotide. On a d'abord supposé que le mélange de ces nucléotides constituait les acides nucléiques qui ne prenaient pas encore figure de véritables entités chimiques. Mais grâce surtout aux travaux de LEVENE, on est aujourd'hui bien fondé à croire que les acides nucléiques ont une existence propre et qu'ils sont constitués par des polynuécléotides.

L'acide nucléique de levure est un tétranucléotide constitué par :

1° L'acide guanosine-phosphorique, ou ester phosphorique du riboside de la guanine; il est identique à l'acide guanylique;

2° L'acide adénosine-phosphorique, ester phosphorique du riboside de l'adénine ou acide adénylique;

3° L'acide cytidine-phosphorique, ester phosphorique du riboside de la cytosine;

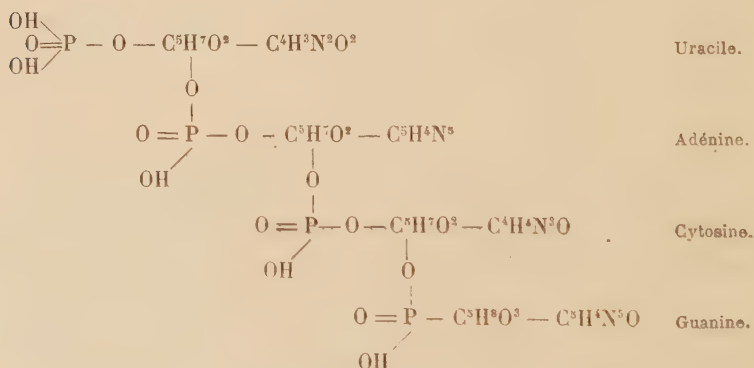
4° L'acide uridine phosphorique, ester phosphorique du riboside de l'uracile.

Jusqu'à présent, aucun de ces fragments de la molécule des acides nucléiques n'a été isolé directement des plantes au cours des processus physiologiques. S'ils ont été obtenus, c'est toujours après hydrolyse au laboratoire. On a ainsi isolé les nucléotides de l'acide nucléique de la levure, du germe de blé, des feuilles de thé, etc... Par contre, des produits d'hydrolyse plus poussés, des combinaisons sucre-base ne renfermant donc plus d'acide phosphorique, des *nucléosides* ont pu être isolés. RITTHAUSEN (1899) a ainsi isolé la vicine du « Vetch meal » qui donne par hydrolyse la divicine : 4,6 dioxy 2,5 diaminopyrimidine et le d. glucose. SCHULZE (1885, 1887) a isolé la vernine d'un certain nombre de plantes vertes. Par hydrolyse, ce nucléoside donne de l'hypoxanthine et le d. ribose (LEVENE et JACOBS, 1909).

Nous avons vu quels étaient les produits d'hydrolyse des acides nucléiques : Voyons maintenant comment ces produits et particulièrement les nucléotides s'assemblent dans la molécule.

Les liaisons peuvent s'effectuer de bien des façons. Les groupements phosphoriques pourraient servir de pivot; dans ce cas, l'acide final n'aurait que deux fonctions acides libres. C'était le premier schéma de LEVENE en contradiction avec la tétrabasicité des acides nucléiques. Les groupements glucidiques pourraient au contraire servir de liaison avec création de trois fonctions éther-oxyde, l'acide ayant 8 H acides. Une fonction alcool de trois groupements sucrés pourrait estérifier l'acide phosphorique du nucléotide voisin donnant un acide à 5 H libres.

Nous n'épuisons pas la série des possibilités et de nombreuses formules ont été proposées par différents auteurs : LEVENE (1909), JONES et ses collaborateurs : RICHARDS (1914), GERMANN (1916), READ (1917-1,2), THANNHAUSER et DOREMULLER (1917), etc. En 1923, LEVENE a donné la formule suivante, qui est généralement adoptée :



OBTENTION DES ACIDES NUCLÉIQUES VÉGÉTAUX. — L'acide nucléique est aujourd'hui extrait sur une grande échelle par l'industrie. Les uns l'extraient au moyen de *solutions alcalines*, d'autres se servent de *solutions de sels neutres*.

BAUMANN (1918) ainsi que SLADE (1905) l'extraient par une solution sodique d'où ils le précipitent par l'acide acétique.

JONES et FOLKOFF (1922) l'extraient de même par la soude étendue, mais le précipitent par l'acide chlorhydrique jusqu'à une concentration de 0,3 à 0,5 % avec addition d'un égal volume d'alcool.

LEVENE et LA FORGE (1910) font l'extraction à partir de la levure par la potasse. Les albumines, dissoutes en même temps, sont précipitées par l'acide picrique, après quoi l'acide nucléique est précipité à son tour par l'acide acétique.

CLARKE et SCHRYVER (1917), après un traitement par l'alcool à 95°, font une longue extraction au moyen du chlorure de sodium à 10 % à la température de 70° C. et une précipitation par l'acide chlorhydrique au 1/2 (90 cm³ de solution chlorhydrique pour 1 K° de germe extrait par 10 litres de solution chlorurée).

M. JAVILLIER et ses collaborateurs ont étudié l'extraction des acides nucléiques. Ils rejettent l'emploi des alcalis en raison de la facilité avec laquelle les acides nucléiques s'hydrolysent en milieu alcalin et donnent la préférence aux solutions de sels neutres, en particulier au ClNa à 12,5 %.

La technique suivante d'obtention, pratiquée par MM. JAVILLIER, ALLAIRE et qui n'a jamais reçu publication, s'applique spécialement à la levure de bière. Elle est applicable à l'extraction industrielle de l'acide nucléique. Pour le traitement de petites quantités de levure, M. JAVILLIER et son collaborateur utilisent une méthode qui est, en principe, celle de CLARKE et SCHRYVER où la durée d'extraction est considérablement réduite et la température d'action de la liqueur chlorurée élevée à la température d'ébullition de cette liqueur.

Voici la note que M. JAVILLIER m'a communiquée sur la méthode industrielle :

« Pour établir notre méthode de préparation, nous nous sommes inspirés des faits suivants vérifiés par l'expérience :

« 1° L'action des alcalis sur l'acide nucléique est très dangereuse, même lorsqu'on limite la durée d'action de l'alcali et qu'on abaisse la température. L'acide nucléique s'hydrolyse facilement par les alcalis même dilués, l'hydrolyse clivant tout d'abord le tétranucléotide en nucléotides. Il paraît donc avantageux d'éliminer complètement les alcalis libres du mode opératoire.

« 2° Le chlorure de sodium dans certaines conditions de concentration et de température entraîne très rapidement en solution l'acide nucléique des cellules d'une façon que l'on peut considérer comme pratiquement quantitative.

« 3° Il faut éviter à tout prix l'action de cet ensemble de diastases que l'on appelle des « nucléases » et qui démolissent complètement la molécule de l'acide nucléique.

« A ces faits, nous avons joint la préoccupation de réduire la durée de l'extraction sans nuire, si possible, aux rendements et d'éviter l'emploi de grandes quantités d'alcool que nécessite le procédé de CLARKE et SCHRYVER.

« Il serait sans utilité de décrire ici le détail des essais que nous avons pratiqués pour atteindre au but et nous nous bornons à transcrire le mode opératoire tel que nous l'employons pour 2 K^{os} de levure fraîche pressée, quantité assez faible pour que la manipulation puisse être effectuée dans tout laboratoire.

« On dissout 650 gr. de NaCl dans 5.000 gr. d'eau ; on porte cette solution à l'ébullition ; à ce moment, on ajoute les 2 K^{os} de levure par *petites portions* de manière à ne pas interrompre l'ébullition (une demi-heure pour les 2 K^{os} de levure). On maintient encore l'ébullition pendant *une heure*. On laisse déposer pendant vingt-quatre heures. Au bout de ce temps, on siphonne la partie claire de la liqueur. Au résidu, on ajoute 2 lit. 1/2 de NaCl à 10 %. On agite énergiquement. On laisse déposer vingt-quatre heures. On siphonne la partie claire qui est ajoutée à la précédente. On essore le résidu.

« Le liquide clair est précipité par addition lente d'acide chlorhydrique à 50 % (il suffit de 3 % de cet acide au 1/2). L'acide nucléique se précipite. Il doit être purifié par la méthode aujourd'hui classique (OSBORNE et HARRIS) de redissolution dans l'acétate de sodium à 10 % et précipitation par HCl. Il est finalement lavé à l'alcool à 50°, puis à l'alcool à 95°, enfin à l'alcool absolu et à l'éther. Ces derniers lavages pouvant être négligés dans une préparation industrielle.

« On obtient un corps retenant une certaine quantité d'eau d'hydratation (10 %), titrant 9 % en phosphore (par rapport à la matière sèche) et 16, 2% en azote, ou des chiffres très voisins, c'est-à-dire un corps très satisfaisant pour les emplois thérapeutiques, et susceptible d'ailleurs de fournir, par purifications

ultérieures, un corps ayant sensiblement les teneurs théoriques en phosphore (9,52 %), en N total (16,11 %), en N purique (10,74 %). Les rendements sont d'un ordre de grandeur très variable avec les différentes races de levure. Ils ont oscillé en produit brut entre 3 et 8 gr. pour 100 gr. de levure sèche. »

MÉTHODES DE DOSAGE DES ACIDES NUCLÉIQUES. — Après tant de travaux entrepris pour étudier la constitution de ces corps et leur obtention, on pourrait croire que la question de leur répartition dans les divers organismes ait aussi reçu une solution satisfaisante. Quoique les premières recherches sur la constitution de ces corps remontent déjà à plus de cinquante ans, nous n'avons encore aujourd'hui que des méthodes imparfaites pour leur détermination quantitative. Comme le faisait remarquer M. JAVILLIER au Congrès de Chimie biologique en 1929, cela tient :

1° A l'absence pour ces corps de réactions typiques susceptibles de servir de base à une méthode analytique ;

2° A la difficulté que l'on rencontre pour les isoler de milieux complexes, non uniformes, où ils se trouvent au milieu d'autres composés phosphorés ;

Plusieurs méthodes ont cependant été proposées et d'ailleurs uniquement en vue du dosage du phosphore nucléique des tissus animaux :

a) La digestion pepsique des tissus basée sur ce fait que la pepsine ne va pas très loin dans la digestion des nucléo-protéides et s'arrête au stade nucléines.

b) Les méthodes par reste, depuis celle de KOSSEL (1882) jusqu'à la plus récente, celle de PLIMMER et SCOTT (1908).

c) Les dosages indirects, par exemple dosage des bases puriques.

Nous n'entrerons pas ici dans la discussion de toutes ces méthodes, ce qui a déjà été fait par M. JAVILLIER dans son rapport de 1929 auquel nous renvoyons. Nous nous contenterons de dire que la résistance des nucléo-protéides à la digestion pepsique est toute relative, comme l'avait observé KOSSEL et que, suivant JAVILLIER et DJELATIDES, les différences entre les préparations diastasiques utilisées s'opposent à toute généralisation de la méthode.

En ce qui concerne le dosage indirect par les bases puriques, disons que la totalité des bases puriques d'un tissu ne fait pas partie intégrante des composés nucléoprotéidiques. Il en est de liées à des nucléotides, de libres même.

Nous insisterons un peu plus sur les méthodes par reste parce qu'elles ont été surtout utilisées en chimie végétale. Elles consistent à épuiser les tissus délipidés et pulvérisés, par des solutions acides de nature et de titre variables. Les composés phosphorés autres que ceux qui sont passés dans l'extrait lipidique et ceux qui sont passés en solution acide sont considérés comme composés nucléiques.

En physiologie végétale plus qu'en physiologie animale, on a fait usage des acides différents pour les extractions. On a ainsi obtenu les chiffres de phosphore soluble les plus variables.

Si comme l'ont fait HART et ANDREWS (1903) on épuise du son ou de la farine de froment par de l'acide acétique à 1 % ou de l'acide chlorhydrique à 0,2 %, on obtient des chiffres de phosphore soluble différents.

Si au lieu d'utiliser de l'acide chlorhydrique à 0,2 % on utilise de l'acide chlorhydrique à 1 %, il en est de même. Autant de concentrations différentes utilisées, autant de résultats différents.

C'est ainsi qu'IWANOW (1902) extrayant les composés phosphorés solubles de graines de fèves au moyen de l'acide acétique à chaud trouvait comme phosphore insoluble ce qu'il appelait phosphore protéique 52,5 %.

Sur le même matériel traité à froid par l'acide chlorhydrique dilué RENGNIER (1911) ne trouvait d'insoluble qu'environ 10 %.

On voit par cet exemple frappant le danger d'une telle méthode qui peut engager l'expérimentateur dans une voie néfaste s'il ne peut déterminer très exactement la nature et le titre de l'acide à employer pour extraire la quantité totale des composés phosphorés solubles, à l'exclusion des composés nucléo-protéidiques. Encore faut-il que ces composés eux-mêmes ne soient pas plus ou moins altérés par un acide trop fort, ou trop concentré, ou par un contact trop prolongé.

Je citerai à cet égard une série d'extractions faites par KOEHLER (1926) d'albumen de ricin au moyen d'acide chlorhy-

drique dont le titre variait de 0,5 à 5 %. Les chiffres de phosphore soluble passaient de 64 à 99 % du phosphore total. A quelle concentration d'acide doit-on s'arrêter pour ne pas solubiliser ou démolir les composés nucléiques? Quel sera le critérium d'une bonne extraction?

D'autre part, pour une poudre végétale dont le phosphore nucléique sera seulement égal à 10 % du phosphore total (ce qui est le cas de la lentille, par exemple), je suppose qu'une extraction acide ait enlevé les autres composés phosphorés à 5 % près, ces 5 % restant dans la poudre en même temps que les composés nucléiques. Cette extraction des composés phosphorés solubles pourra être considérée comme assez bonne en elle-même, mais les 5 % qui n'ont pas été enlevés que deviennent-ils?

Puisque le phosphore nucléique se calcule par différence, ils s'ajouteront donc au 10 %, ce qui nous fera une erreur de 33 % sur le chiffre réel de phosphore nucléique.

On comprend aisément après cet exposé que le besoin se soit fait sentir d'une méthode d'extraction directe du phosphore nucléique. Nous verrons dans un prochain chapitre comment nous avons pu adapter la méthode que MM. JAVILLIER et ALLAIRE avaient établie en vue de l'étude d'organes animaux (1925, 1,2, 1929, 1931), à l'étude d'un certain matériel végétal : la poudre de germe de blé, de graines de lentille, de graines de tournesol.

Les expérimentateurs qui nous ont précédé dans cette étude, pour ce qui est du domaine de la chimie végétale n'ayant pu mettre au point de méthode précise d'isolement des composés nucléo-protéidiques et par conséquent de véritable dosage du phosphore nucléo-protéidique, nous ne pouvons accepter sans réserve les résultats qu'ils ont obtenus, notamment dans l'étude du métabolisme phosphoré au cours de la germination des graines.

Partant d'un chiffre certainement trop élevé de phosphore nucléique, IWANOFF (1902) par exemple au cours d'une germination de fève voit ce chiffre passer de 52,5 % de phosphore total avant germination à 37,4 puis à 13,5 et à 0.

Selon ces expériences il faudrait admettre que le phosphore nucléique baisse dans de fortes proportions au cours de la germination et disparaît même.

L'expérience suivante faite par M^{lles} KARAPÉTOFF et SABACHNIKOFF (1902) utilisant la méthode de dosage des nucléoprotéides au moyen de la pepsine indique des variations opposées. Ces deux expérimentatrices étudiaient les effets de la privation des aliments sur la transformation des protéines non digestibles ou nucléines.

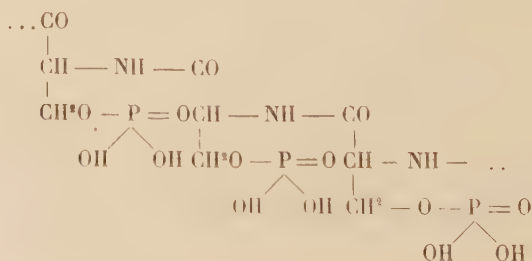
Après avoir coupé les germes de quinze jours du froment et de l'orge, elles les partagèrent en deux parties : l'une fut tuée instantanément par chauffage, l'autre fut d'abord privée de lumière et d'aliments pendant quelques jours. Pendant les neuf premiers jours qui suivirent, les protéines non digestibles ne se décomposèrent pas, leur quantité augmenta, comparativement au lot qui avait été tué par la chaleur.

Il semble donc ici qu'il y ait eu formation de composés nucléiques chez les jeunes plantules au début de la germination.

III. — *Les phosphoprotéides.*

Les phosphoprotéides sont des hétéroprotéides phosphorés insolubles dans l'eau, solubles dans les alcalis qui, contrairement aux nucléoprotéides, ne donnent pas à l'hydrolyse de bases puriques ou pyrimidiques, ni de glucides. Leurs produits d'hydrolyse sont, en dehors de l'acide phosphorique, des amino-acides comme pour toute matière protéique en quantité notable, des bases hexoniques et de la sérine.

Le type de ces phosphoprotéides est dans le monde animal le caséinogène de la sécrétion lactée, dans lequel, selon POSTERNAK, le noyau phosphoré est constitué par l'enchaînement d'un certain nombre d'acides sérine-phosphorique (1927).



Un autre type de ces composés est la vitelline du jaune d'œuf (POSTERNAK T., 1928).

L'on connaît aussi des caséines végétales. Le type de celles-ci est représenté par la zymocaséine de la levure isolée par P. THOMAS (1919).

Par analogie, dit CZAPEK (1922), on a pensé qu'une partie des réserves des graines était constituée par des substances semblables. C'est ainsi que HOPPE-SEYLER suggéra que l'amande de *Bertholletia excelsa* et de *Pisum sativum* L., contenait un protéide semblable à la vitelline du jaune d'œuf. Il ne parlait malheureusement pas du phosphore qui eût dû y être présent.

REINKE (1881) dans son analyse du plasmode d'*Oethalium septicum* indique la présence de 5 % de vitelline.

IV. — La phytine et les composés phytiniques.

En 1872, PFEFFER, utilisant la méthode de séparation des grains d'aleurone de MASCHKE (1859), et de SACHSSE (1876) découvrait dans ces grains un composé phosphoré qui fut isolé par PALLADINE en 1895 de *Lupinus luteus* L., de *Vicia sativa* L., et de *Sinapis nigra*.

Sur les indications de PALLADINE l'année suivante, SCHULZE et WINTERSTEIN l'ont extrait de *Sinapis nigra* et ont ébauché son étude.

WINTERSTEIN en 1897 montre que sous l'action de l'acide chlorhydrique à 130-140°, la phytine se décompose en inosite et acide phosphorique. Par l'analyse, il déduit que le composé n'est autre que l'ester hexaphosphorique de l'inosite.

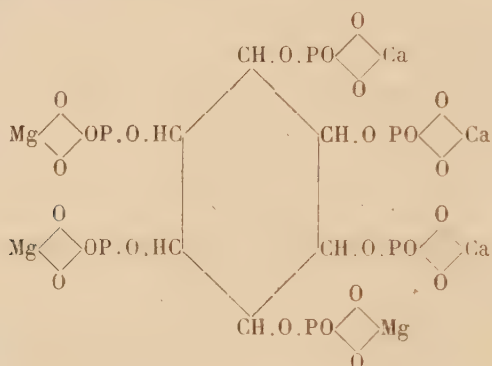
POSTERNAK, en 1900, et les années suivantes (1903 1, 2, 3), arrive aux mêmes produits d'hydrolyse. L'analyse élémentaire lui fait toutefois assigner au produit la formule brute : $C_8H_{12}P_6O_9$, et ensuite la formule de structure :



1. L'on classe les protéides en holoprotéides et hétéroprotéides. Ces derniers se subdivisent en : glycoprotéides, phosphoprotéides, nucléoprotéides et chromoprotéides.

Une raison importante qui conduisait POSTERNAK à donner une telle formule à ce composé était la grande résistance qu'il offrait aux alcalis à 100°, résistance qui ne se rencontre généralement pas dans les esters connus jusqu'à présent.

Selon WINTERSTEIN (1908), NEUBERG (1907), SUZUKI, YOSHIMURA et TAKAISHI (1907), CONTARDI (1909, 1910), ce corps serait un sel calcique et magnésien de l'ester hexaphosphorique de l'inosite. La formule suivante représenterait cet ester hexaphosphorique dont les acidités seraient également saturées par Mg et par Ca.



Se basant sur le fait que le principe phospho-organique était décomposé quantitativement en inosite et acide phosphorique dans la proportion d'une molécule de $C^6H^{12}O^6$ pour six molécules de PO^4H^3 , il paraissait en effet naturel d'admettre que le principe représentait l'ester hexaphosphorique de l'inosite. Mais sa composition ne répondait pas à la formule $C^6H^{18}O^{24}P^6$ d'un pareil ester. Les analyses de l'acide libre et de ses sels conduisaient à la formule $C^6H^{24}O^{27}P^6$ qui diffère de l'hexaphosphate par trois molécules d'eau en plus.

La synthèse vint appuyer l'hypothèse d'un ester hexaphosphorique. POSTERNAK (1919, 3) réussit à préparer par chauffage de 6 gr. d'inosite avec 28 gr. d'acide phosphorique (en faisant usage d'anhydride phosphorique comme déshydratant) un sel calcique et sodique de l'ester phosphorique que ses devanciers NEUBERG et KRETSCHMER (1911), ANDERSON (1912), CONTARDI (1909, 1910) n'avaient pas réussi à préparer. Ce produit ne se distinguait en rien de celui qu'on obtenait en par-

tant de la phytine naturelle. On pouvait donc conclure que le principe phospho-organique des plantes possède bien la constitution de l'ester hexaphosphorique malgré les trois molécules d'eau qu'il renferme en excès et qu'il retient obstinément.

Toutefois, ANDERSON (1920), utilisant le procédé indiqué par POSTERNAK, ne réussit après cela qu'à isoler un acide inosito-tétraphosphorique $C^6H^{12}O^{16}P^4$ ayant sensiblement la même teneur en phosphore que l'acide phytinique, mais de propriétés et de réactions différentes.

PRÉPARATION DE LA PHYTINE. — 1° *A partir des graines oléagineuses.* — On a préparé la phytine de plusieurs manières et on a aussi obtenu bien souvent des produits différents selon les méthodes.

SCHULZE et WINTERSTEIN en 1896 ont préparé la phytine en traitant les graines déshuilées de *Sinapis nigra* par une solution de chlorure de sodium à 10 %. Ils ont coagulé les protéines par la chaleur et ont filtré bouillant; la phytine moins soluble à froid qu'à chaud précipitait par refroidissement.

WINTERSTEIN l'année d'après a préparé la phytine en épuisant les graines par l'acide acétique dilué et précipitant par l'ammoniaque.

POSTERNAK (1903, 1) eut recours à un procédé tout à fait différent. Les graines déshuilées ont été épuisées par l'acide chlorhydrique très dilué, la solution obtenue a été traitée par un sel de cuivre qui a précipité la phytine. Le précipité a été décomposé par l'hydrogène sulfuré et on obtenait ainsi une phytine soluble dans l'eau, tandis que la phytine de SCHULZE et WINTERSTEIN était insoluble.

CLARKE (1914) a préparé la phytine des graines de moutarde de l'Inde, mélange de graines de *Brassica juncea* et de *Brassica campestris*, au moyen de l'acide acétique à 4.5 %. L'ammoniaque précipitait ensuite un produit brut que l'on purifiait par redissolution dans l'acide acétique à 8 %, et précipitation par l'ammoniaque. Une dernière dissolution dans l'acide acétique laissait précipiter à l'ébullition un produit pur qui était recueilli, lavé et séché.

2° *A partir des céréales, des légumineuses.* — On peut aussi se servir de graines de céréales ou de légumineuses ou de

germes isolés de ces graines. On connaît en effet la richesse des germes en phytine.

POSTERNAK (1903, 1) conseille de faire dans ce cas l'extraction par l'eau, d'alcaliniser ensuite franchement par la soude et de précipiter par le chlorure de calcium. Le précipité est ensuite lavé, puis dissous dans l'acide chlorhydrique dilué. L'opération est ensuite continuée comme plus haut.

PROPRIÉTÉS. — La phytine obtenue par les procédés indiqués par POSTERNAK (1903, 1) est une poudre blanche de saveur acidulée, contenant environ 22 % de phosphore organique, 12 % de calcium, 1,5 % de magnésium. MAROTTA et CALO (1932), isolant la phytine de différentes plantes, trouvent des chiffres de phosphore, de calcium, de magnésium un peu différents, selon les plantes.

Selon POSTERNAK, elle est lentement soluble dans l'eau à laquelle elle communique une réaction nettement acide au tournesol.

Les conditions de précipitation ressemblent, en général, à celles de l'acide phosphorique. Cependant, les solutions aqueuses donnent un précipité blanc par le réactif molybdique à froid, un précipité blanc jaunâtre par le chlorure ferrique en milieu acide, un précipité blanc par l'azotate d'argent en milieu neutre.

La phytine, en solution légèrement acide, traitée par l'acétate de calcium, donne un précipité blanc constitué par un phytinate acide de calcium qui peut permettre la préparation d'un sel double de calcium et de sodium cristallisé. Ce sel séché à 120° répond à la formule $C^6H^{12}P^6O^{27}Ca^2Na^2$ (1919, 1).

POSTERNAK a également réussi à préparer un phytinate de sodium cristallisé, hydraté à 44 molécules d'eau, qui, séché à 120°, répond à la formule suivante : $C^6H^{12}O^{27}Na^{12}$; ce sel se prête à la préparation facile de l'acide libre et de ses différents sels.

« La préparation de ces sels cristallisés » contribuera, dit POSTERNAK (1919, 1), « à faire mieux connaître le principe phospho-organique de réserve des plantes vertes, si répandu dans la nature, et auquel les auteurs comme VORBRÖDT (1910), CLARKE (1914), RATHER (1918), etc., attribuent encore une composition inexacte. »

Chauffée à 150°-160° pendant trois heures avec l'acide sulfurique au tiers (POSTERNAK, 1903) ou à 118° pendant huit heures (LANGE, 1933), la phytine est décomposée en inosite et acide phosphorique.

L'hydrolyse par la diastase du germe de blé ou du son de froment du phytinate de sodium donne le tétraphosphate et, si on prolonge l'action du ferment, les tri-, di- et monophosphates d'inosite (POSTERNAK, 1929).

Le sang et le foie de veau décomposent la phytine (MAC COLIUM et HART, 1908) avec mise en liberté d'acide phosphorique, tandis que les enzymes du tube digestif n'exercent aucune influence sur elle.

Cette action des ferments sur l'hexaphosphate explique que l'on trouve également des esters inférieurs dans les plantes. BOUTWELL (1917), POSTERNAK (1928, 1929), WIAZOWNICKA (1933), ont réussi à isoler du germe de blé un ester inositolotétraphosphorique.

ANDERSON a isolé des graines d'érable (1920) un hexaphosphate qu'il avait d'abord pris pour un pentaphosphate, et du son de froment, un monophosphate (1914) et un triphosphate (1915). Ce triphosphate a aussi été isolé par RATHER en même temps qu'un pentaphosphate (1917, 1918).

On voit par là que les combinaisons de l'inosite et de l'acide phosphorique dans les graines sont assez variées. Voyons, en quelques mots, ce qu'est l'inosite : c'est un polyalcool cyclique extrêmement répandu dans les végétaux. Elle a été signalée depuis longtemps par WOHL (1856), HILZER (1871), NEUBAUER (1873), TANRET et VILLIERS (1881), MAQUENNE (1853) qui a établi sa constitution.

MEILLÈRE, en 1908, signalait sa présence dans la plupart des organes végétaux : feuilles fraîches, tiges herbacées, tiges bulbeuses des plantes à oignons, tubercules souterrains, bourgeons étiolés, racines charnues, inflorescences, fruits verts de *Phaseolus vulgaris* L., *Pisum sativum* L., *Ervum lens*, etc., graines oléagineuses et amylacées à la phase de prématurité, germes.

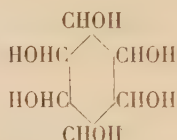
On peut l'isoler en déféquant les jus de plantes par un sel neutre de plomb, puis précipitant par un sel basique qui entraîne le corps cherché.

Ce polyalcool cyclique est moins riche en hydrogène que les mannites.

Il possède une formule isomérique de celle du glucose ; il n'est pas réducteur. Par oxydation, il ne donne ni aldéhyde ni acide à même nombre d'atomes de carbone.

Sous l'action de l'acide iodhydrique et du phosphore rouge, on obtient des dérivés aromatiques dérivés du cyclohexane.

La formule de l'inosite, ou plus exactement des inosites, est la suivante :



On connaît : une inosite droite ; une inosite gauche ; des inosites inactives (théoriquement 7).

L'inosite ne comportant pas de carbone asymétrique, l'activité optique est conférée naturellement par la dissymétrie moléculaire.

On peut caractériser l'inosite par transformation en oxyquinones colorées. On arrose un cristal de la substance essayée avec quelques gouttes d'acide azotique ; on évapore à sec au bain-marie, puis on ajoute une goutte d'ammoniaque et autant de chlorure de calcium ; on obtient une belle coloration rouge (SHERER).

Pour avoir une oxydation plus complète, on peut répéter une deuxième fois l'oxydation par l'acide azotique (TANRET et VILLIERS).

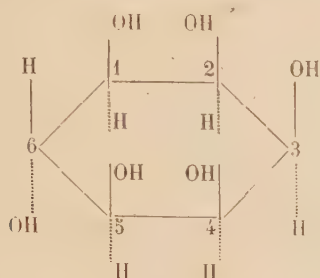
On peut aussi remplacer le chlorure de calcium par l'acétate de strontium qui donne une coloration plus intense.

GALLOIS caractérise l'inosite en la chauffant avec un peu d'azotate mercurique qui donne un précipité jaune devenant rouge par la chaleur et se décolorant par refroidissement. Cette réaction est beaucoup moins sensible que la précédente.

Ces deux réactions avec des variantes ont été très bien étudiées par M. DENIGES qui les a rendues plus sensibles et d'exécution plus facile.

A l'occasion d'un travail sur le tétraphosphate du germe de blé, POSTERNAK (1929) est arrivé à démontrer la configuration

de l'inosite naturelle et à établir sa formule développée qu'on peut représenter avec cinq oxhydriles en position cis :



L'inosite peut être dosée par la méthode de FLEURY et MARQUE (1929) comme l'a montré récemment LANGE (1933).

FORMATION DE LA PHYTINE. — SA RÉPARTITION DANS LES ORGANES VÉGÉTATIFS. — SON ÉVOLUTION DANS LA GERMINATION. — L'inosite, comme nous l'avons vu plus haut, est répandue dans la plupart des organes végétaux. Est-elle estérifiée par l'acide phosphorique dans ces mêmes organes et transportée par la suite dans les graines, ou bien l'estérification se ferait-elle dans la graine ? On indique généralement l'absence de phytine dans les parties végétatives de la plante. HART et TOTTINGHAM (1909) n'ont pu la mettre en évidence dans le rutabaga. DE TURK, HOLBERT et HOWK (1933), étudiant les parties végétatives du blé avant la pollinisation et deux semaines après, n'ont pu caractériser la phytine par le perchlorure de fer.

Il est à noter toutefois qu'HENRICI (1927), étudiant les composés phosphorés des plantes grasses de l'Afrique du Sud, en signale dans les feuilles d'*Eragrostis abyssinica*, où il put mettre en évidence 0 gr. 022 % de phosphore phytinique par la méthode d'HEUBNER et STADLER (1914) et 0 gr. 047 % de phosphore minéral, ces chiffres étant calculés en P_2O_5 .

De jeunes feuilles de *Monocymbium cerasiiforme* contenaient 0 gr. 061 % de P_2O_5 solubles dans l'eau qui étaient constitués par de la phytine. En fin de végétation, quand les graines se formaient, une partie du phosphore soluble avait disparu, il restait toutefois encore du phosphore phytinique.

Un travail de KNOWLES et WATKIN (1932) signale que 95 %

du phosphore soluble total contenu dans les parties végétatives du blé séchées à la température du laboratoire sont constitués par de la phytine.

Il semble d'après ces dernières expériences que la phytine pourrait se former dans les feuilles pour émigrer vers la graine. C'était déjà l'hypothèse de SCHIMPER et POSTERNAK (1900).

Il est en tout cas certain que la phytine se trouve en proportion élevée dans les graines. Elle existe dans la proportion de 50 à 80 % du phosphore total. Les teneurs varient d'ailleurs suivant les conditions dans lesquelles les plantes ont poussé : PAROZZANI (1908), STANISKIS (1909), LEWONIESKA (1911), JENTYS (1915). POSTERNAK (1903), qui précipitait la phytine par l'acétate de cuivre, signalait dans le sapin rouge, le chènevis, le tournesol, la lentille, le haricot, de 80 à 95 % de phosphore total sous forme phytinique.

WEBSTER (1928) dans 11 graines différentes trouve 65 % et seulement dans deux espèces moins de 50 %.

VORBRODT (1910) montra une accumulation de ce principe dans les embryons de maïs qui contenaient quarante-trois fois plus que les albumens.

BERNARDINI (1912) montra une accumulation semblable dans les embryons de riz qui contenaient 82 % de leur phosphore sous forme phytinique.

Quelques auteurs ont étudié les variations de la phytine au cours de la germination. BERNARDINI et MORELLI (1912) la précipitant par l'acétate de cuivre, la voient diminuer au cours de la germination du blé.

De TURK, HOLBERT et HOWK (1933) utilisant la méthode d'HEUBNER et STADLER sur la même graine voient une diminution de 35 % en six jours. Après cette période, ils trouvent que la méthode n'est plus assez fidèle pour poursuivre l'expérience.

Il découle de ceci que la phytine constitue une des formes de réserve du phosphore qui est utilisée au cours de la germination.

V. — *Le phosphore minéral.*

A côté des composés phosphorés que nous venons de décrire, il existe encore dans les graines du phosphore sous forme de

sels minéraux. Ces sels sont essentiellement des ortho-phosphates.

On a pu mettre en évidence des métaphosphates, des hypophosphites, des phosphites, mais dans des cas tout à fait particuliers, les plantes avaient été cultivées sur des milieux renfermant ces sels (MENGDEHL 1933).

Les recherches de VORBRDIT (1910), de M^{me} STCHEPETILNIKOFF (1918) ont montré que la méthode de SCHULZE et CASTORO (1904) recommandée par JEGOROW (1912) qui consistait à précipiter les phosphates par la liqueur magnésienne en présence de citrate d'ammoniaque ne se prêtait pas au dosage du phosphore minéral. La liqueur magnésienne précipite en effet la phytine.

Différents auteurs : STUTZER (1908), VORBRDIT (1910), SEIDLER (1913), HEUBNER (1914), ROGOZINSKI (1915-1916), ADLER (1915-1916) ont utilisé la méthode molybdique qu'avait déjà préconisée, en 1905, IWANOFF pour précipiter les phosphates minéraux en présence de matières organiques.

VORBRDIT (1910), KOEHLER (1926) recommandent d'ailleurs une première précipitation magnésienne suivie d'une dissolution dans l'acide azotique et d'une précipitation par la liqueur molybdique à chaud jusqu'à ébullition.

Une autre méthode préconisée par COLLISON (1912) consistait à traiter la poudre délipidée par l'alcool à 95° contenant 0,2 % d'acide chlorhydrique. Le phosphore soluble précipité par l'ammoniaque était considéré comme phosphore minéral.

Les composés minéraux du phosphore constituent d'après les auteurs une portion minime des composés phosphorés des graines. Ils font leur apparition dans la graine au moment de la germination. IWANOW (1902), BERNARDINI et MORELLI (1912), ZLATAROFF (1916) ont montré qu'ils provenaient du phosphore organique et principalement du phosphore phytinique.

CHAPITRE II

TECHNIQUES ÉTUDIÉES EN VUE DE LA SÉPARATION ET DU DOSAGE DES PRINCIPES IMMÉDIATS PHOSPHORÉS DES GRAINES

Le chapitre précédent nous a fait connaître les types essentiels de principes immédiats phosphorés que l'on rencontre dans les graines. Il s'agit maintenant de savoir les séparer les uns des autres et de pouvoir doser le phosphore inclus dans ces diverses molécules ce que nous appellerons le phosphore *lipidique, nucléoprotéidique, phytinique, minéral*.

A. — EXTRACTION DES LIPIDES. — DOSAGE DU PHOSPHORE LIPIDIQUE.

Nous avons utilisé la méthode de KUMAGAWA (1910-1911) qui a été perfectionnée par M. LEMELAND (1921-1922-1923) à l'occasion d'une étude sur les lipides sanguins et dont nous avons, au laboratoire de M. JAVILLIER, suivi l'application à des tissus animaux. J'ai appliqué cette technique dès 1929 aux tissus végétaux et nous l'avons vu appliquer par d'autres expérimentateurs : MM. HÉE et BAYLE (1932), MANCEAU, REVOL, CHARMILLON (1932), ECHEVIN (1934).

Un poids convenable (10 gr. par exemple) de la matière première aussi finement divisée que possible est épuisé dans l'extracteur de KUMAGAWA pendant un temps suffisant et qui variera avec la substance envisagée. La poudre de lentilles réclamera par exemple douze heures d'extraction, tandis que le germe de blé verra ses lipides enlevés au bout de deux heures. La liqueur alcoolique est mise de côté et l'épuisement de la

matière est complété par une lixiviation de deux heures avec de l'éther. Liqueur éthérée et liqueur alcoolique sont réunies. La liqueur éthéro-alcoolique ou une portion connue de celle-ci est distillée sous pression réduite (20 mm.) au bain-marie. Quand il ne reste plus dans le ballon que de l'alcool très étendu, et que la mousse se produit, on introduit par le tube à robinet disposé à cet effet 10 cm³ d'alcool à 96°. On maintient le vide et on concentre presque à sec. On fait une deuxième affusion d'alcool à 96° suivie de distillation, puis une troisième de 10 cm³ d'alcool absolu, en ayant soin de rincer soigneusement le col et les parois du ballon.

On pousse le vide jusqu'à 10 à 15 mm. de mercure et à ce moment seulement le ballon qui, jusque-là reposait sur les rondelles du bain-marie est plongé dans l'eau bouillante et agité constamment. En deux ou trois minutes, on obtient un résidu bien sec.

Il ne faut pas prolonger la dessiccation à 100° qui pourrait entraîner l'insolubilisation des lipides phosphorés dans leurs solvants habituels.

Le résidu doit être toutefois parfaitement déshydraté. Nous allons en effet le reprendre par l'éther anhydre en quantité suffisante pour enlever les phosphatides, sans dissoudre d'autres composés phosphorés organiques ou minéraux qui ont pu être entraînés au cours de l'extraction alcoolique. Deux extractions, chacune par 30 cm³ d'éther bouillant, faites au bain-marie, au réfrigérant à reflux, suivies d'un dernier lavage par 20 cm³ d'éther suffisent pour les quantités envisagées. Les solutions éthérées réunies sont filtrées sur un petit filtre à plis.

M. LEMELAND (*loc. cit.*) et M^{me} HINGLAIS (1928) recommandent pour les tissus animaux de faire suivre cette extraction éthérée d'une extraction benzénique, qui peut parfois enlever encore une certaine quantité de phosphatides. Nous nous sommes rendu compte que dans le cas de la lentille cette dernière extraction par le benzène anhydre ne récupérerait que des fractions insignifiantes de phosphatides et pas du tout dans le cas du germe de blé.

Les solutions éthéro-benzéniques sont distillées, les résidus minéralisés et le phosphore est dosé par la méthode de COPAUX.

Nous pensons qu'il y a avantage à rester fidèle à la méthode

de traitement préliminaire par l'alcool, suivi du traitement à l'éther. L'alcool agit non seulement par son pouvoir solvant des lipides, mais encore il intervient pour rompre les liaisons d'ordre physique entre les substances lipidiques et les matières protéiques. L'expérience montre que les extractions à l'éther seul sont loin d'enlever la totalité des lipides.

Le traitement par le benzène anhydre sera aussi à conserver. Dans une expérience nous avons d'abord épuisé un germe de blé par l'éther, puis par l'alcool. Les deux liquides ont été traités à part, distillés; les résidus desséchés ont été épuisés par l'éther et le benzène anhydres. Le résidu de l'extraction alcoolique qui ne contenait plus les lipides non phosphorés enlevés par le traitement éthéré s'est montré insoluble dans l'éther anhydre et soluble dans le benzène anhydre. Cet extrait benzénique renfermait du phosphore qu'il est légitime de considérer comme lipodique. L'absence de lipides non phosphorés sans doute rendait compte de cette insolubilisation dans l'éther anhydre.

CRITIQUE DE LA MÉTHODE D'EXTRACTION DES LIPIDES. — La méthode d'extraction des lipides telle que nous l'utilisons prête à certaines critiques, comme l'a fait remarquer M. LEMELAND à propos des tissus animaux.

Le benzène peut dissoudre certaines substances phosphorées qui ne sont pas précipitables par l'acétone et qui ne devraient donc pas être comptées comme lipidiques. Mais comme le fait remarquer M^{me} HINGLAIS (1928) dans sa *Thèse*, l'insolubilité stricte dans l'acétone ne paraît pas être un caractère qui doive nécessairement entrer dans la définition d'un phosphatide.

D'autre part, d'après Mac LEAN (1912) et M^{lle} LEBRETON (1921) il existe des impuretés phosphorées dans le phosphore lipidique total éthéro-soluble et par suite éthéro-benzénosoluble, des tissus animaux. Cette critique peut évidemment être énoncée aussi au sujet de nos tissus végétaux et peut-être serait-il préférable de précipiter les phosphatides de l'extrait éthéré par de l'acétone en présence de chlorure de magnésium. Le précipité serait ensuite purifié selon le procédé de Mac LEAN, pour le débarrasser des impuretés phosphorées qu'il contient. Ces impuretés seraient des combinaisons de l'acide glycéro-phos-

phorique, termes intermédiaires entre cet acide et les phosphatides.

Malheureusement, la technique de M^{lle} LEBRETON, longue et délicate, devient d'une application difficile quand il s'agit d'extraire une petite quantité de phosphatides comme celle qui se trouve dans les graines.

Aussi avons-nous conservé la technique telle que nous l'avons exposée plus haut, et nous appellerons phosphore lipidique le phosphore éthéro-benzéno-soluble après traitement préliminaire par l'alcool comme il a été décrit.

MINÉRALISATION DES COMPOSÉS PHOSPHORÉS. — MÉTHODE SULFO-NITRIQUE. — Avant d'aller plus loin dans notre étude des composés phosphorés, il nous faut dire deux mots des méthodes que nous avons utilisées pour minéraliser nos composés phosphorés organiques et pour doser le phosphore.

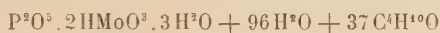
La méthode de destruction sulfo-nitrique que nous avons utilisée est celle qui était en usage au laboratoire de M. JAVILLIER et qui, à la condition qu'elle soit judicieusement conduite, ne laisse pas place à une perte appréciable de phosphore. Récemment, MM. ÉCHEVIN et CRÉPIN (1928) l'ont appliquée aux substances végétales et à cette occasion en ont fait un contrôle rigoureux par son application parallèle au mycélium du *Sterigmatocystis nigra* et à son liquide de culture.

Nous dirons simplement que pour mener à bien une destruction sulfo-nitrique il est absolument nécessaire d'éviter toute surchauffe qui pourrait causer des pertes appréciables de phosphore. L'oxydation doit être poursuivie à une douce chaleur sans brusquer le chauffage sous prétexte d'abréger la durée de l'opération. L'addition d'acide nitrique sera pareillement faite goutte à goutte en faisant couler l'acide le long des parois.

On prendra, pour réaliser une minéralisation, une quantité de matière première telle qu'elle contienne de 1 à 3 milligr. de phosphore.

DOSAGE DU PHOSPHORE PAR LA MÉTHODE DE COPAUX. — Cette quantité de phosphore nous permettra d'introduire le résidu de la destruction que l'on aura fait bouillir avec un peu d'eau, dans une ampoule de COPAUX en vue du dosage.

Le dosage du phosphore minéral, par l'élégante méthode de COPAUX (1921) a été appliqué aux questions intéressant la chimie physiologique par M. JAVILLIER et ses collaborateurs, qui ont en particulier utilisé cette technique au dosage de quantités de phosphore de l'ordre de 1 à 3 milligr. Nous rappellerons le principe de la méthode, renvoyant le lecteur au mémoire original de COPAUX et à la *Thèse* de M^{me} HINGLAIS (1928) qui en a fait une étude critique. Une solution d'un phosphate, additionnée d'un acide minéral (sulfurique, chlorhydrique, nitrique, etc.) et agitée en présence d'éther avec un molybdate alcalin, donne lieu à la formation d'acide phospho-molybdique qui s'unit à l'éther et à l'eau pour former un complexe liquide de couleur jaune, de densité élevée, non miscible à son eau mère et qu'on peut séparer par centrifugation. Le volume du complexe peut être exactement déterminé en opérant dans des ampoules de forme particulière et graduées en quarantièmes de centimètre cube. La formule du complexe admise par COPAUX est la suivante :



B. EXTRACTION DES AUTRES PRINCIPES IMMÉDIATS PHOSPHORÉS. —

1° EXTRACTION PAR LES ACIDES. — Les phospho-amino-lipides étant extraits par la méthode de délipidation précédemment décrite, la poudre renferme tous les autres principes phosphorés. Certains (phytine et phosphates) sont solubles en milieu légèrement acide, tandis que les autres (nucléoprotéides) sont insolubles.

Pour obtenir les premiers il semble tout à fait logique de les extraire au moyen des acides dilués. C'est d'ailleurs ce qu'ont fait jusqu'à présent les expérimentateurs. Les uns se sont contentés d'opérer une seule extraction de trois heures; les autres ont procédé par extractions répétées.

C'est ainsi que HART et ANDREWS (1903) ont traité par de l'acide acétique à 1 % et par de l'acide chlorhydrique à 0,2 %, différents produits d'origine végétale, des farines d'avoine, de froment, de maïs, de malt, du son de froment, et ont dosé le phosphore soluble total ainsi que le phosphore minéral dans les extraits. L'acide acétique extrayait en général plus de phosphore soluble total que l'acide chlorhydrique.

VORBRÖDT (1910) étudiant la farine d'orge arrivait aux mêmes résultats.

ROGOZINSKI (1916) se servait soit d'eau, soit d'acide acétique à 1 %.

ZALESKI (1912) se servait d'acide chlorhydrique à 0,2, à 0,5, voire même à 1 %. L'acide plus concentré était en mesure d'extraire de plus fortes quantités de composés phosphorés de l'embryon de froment et de la graine de pois.

IWANOW (1902) faisant germer des graines de *Vicia faba* L., étudiait les composés phosphorés solubles dans l'acide acétique à chaud. ZLATAROW (1916) opérait de même au cours de la germination de *Cicer arietinum* L.

BERNARDINI faisait des extractions par l'acide chlorhydrique à 1 % en vue d'extraire les composés phosphorés du germe de riz (1912) et à l'occasion d'une étude sur la germination du grain de froment (1912, 2).

RATHER (1917) extrayait les composés phytiniques de différentes graines au moyen de l'acide chlorhydrique à 1,2 %, ANDERSON (1915) AVERILL et KING (1926) utilisaient l'acide à 2 %, de même récemment de TURK, HOLBERT et HOWK (1933) étudiant les composés phosphorés solubles au cours de la germination du maïs.

Mais ce sont surtout KOEHLER (1926, 1929), M^{lle} MINKOWSKA (1926), M^{lle} LINDENBAUM (1926), M^{lle} MNICH (1931), PISCHINGER (1932), WIAZOWNICKA (1933) qui se sont occupés de la solubilité des composés phosphorés dans les solutions acides. Ces auteurs ont étudié l'action des différents acides à différentes concentrations.

Il résulte de leurs expériences que la courbe de solubilité des composés phosphorés affecte une allure particulière en relation avec l'acidité du milieu. La forme particulière de ces courbes avait pour cause selon KOEHLER le fait que suivant l'acidité du milieu il devait se former des composés insolubles de protéines et d'acides phytiniques.

M^{lle} LINDENBAUM dans ses expériences sur la farine d'avoine confirma en partie cette hypothèse.

Mais c'est M^{lle} MNICH qui la vérifia de la façon suivante : Elle fit des extractions de protéines de *Vicia faba* par la méthode d'OSBORNE et STRAUSS par dialyse. D'autre part elle fit des

extractions de phytine par la méthode de M. POSTERNAK. A l'aide de cette protéine et de cette phytine, elle prépara une série d'extraits dans lesquels elle fit varier seulement l'acidité : les quantités de protéines et de phytine étaient sensiblement les mêmes que celles contenues dans la poudre de *Vicia faba*. A chaque concentration, il passait en solution une certaine quantité de composés phosphorés. C'est ainsi qu'à :

pH = 6,7 il passait en solution 91,8 % du P. total.			
	5,8	—	73
	5,4	—	68,9
	5,1	—	64,4
	4,6	—	44
	4,1	—	19,6
	3,1	—	0,7
	2,6	—	22,4
	2,4	—	25,5
	2,2	—	29,6
	1,8	—	47,9
Avec HCl	0,5 %	—	97,9
	1 %	—	97,6
	5 %	—	99,8

De cette expérience, l'auteur conclut que si à pH 3,1 il y a si peu de composés phosphorés en solution, c'est que les protéines se lient au maximum à la phytine à ce pH, formant ainsi une combinaison insoluble. La faculté pour la phytine de se combiner aux protéines diminuerait au fur et à mesure de l'augmentation de l'acidité pour devenir nulle dans une solution d'acide chlorhydrique à 0,5 et à 1 %. On arrive de la sorte à se prononcer en faveur des extractions à 0,5 ou à 1 % HCl.

Nous avons voulu nous rendre compte de la solubilité des composés phosphorés de la poudre de lentilles dans l'acide chlorhydrique à 1,2 % (équivalant à 3 % en volume de la solution d'HCl, de densité = 1,19). Nous opérions des extractions multiples que nous répétions jusqu'à ce que les extraits ne contiennent plus de composés phosphorés comme l'avaient fait ULRICH (1912) ainsi que ARBENZ (1922).

Nous prenions 2 gr. 50 de poudre que nous traitions pendant trois heures par 100 cm³ d'acide chlorhydrique à 1,2 %; au bout de ce temps, nous centrifugions et faisons deux nouvelles extractions de deux heures avec 50 cm³ de solution, puis deux

de une heure et demie avec 50 cm³. Chaque traitement se faisait avec agitation continuelle dans un flacon où la poudre se trouvait en contact avec des billes de verre.

Le tableau suivant résume deux expériences successives faites sur une poudre délipidée contenant encore 0 gr. 294 % de phosphore.

	VOLUME d'HCl utilisé	PREMIÈRE SÉRIE d'extractions		DEUXIÈME SÉRIE d'extractions	
		P. soluble de 2 gr. 50 de poudre	P. soluble de 100 gr. de poudre	P. soluble de 2 gr. 50 de poudre	P. soluble de 100 gr. de poudre
		milligr.	gr.	milligr.	gr.
Première extraction . . .	100	4,72	0,189	4,78	0,192
Deuxième extraction . . .	50	1	0,040	1,1	0,044
Troisième extraction . . .	50	0,55	0,022	0,35	0,014
Quatrième extraction . . .	50	0,30	0,012	0,25	0,010
Cinquième extraction . . .	50	0,03	0,001	0,06	0,002
Total	300	6,60	0,264	6,54	0,262

Les cinq extractions successives ont enlevé, semble-t-il, tout le phosphore acido-soluble. Mais nous sommes là en présence d'une grande quantité de liquide contenant relativement peu de phosphore en solution puisque les 300 cm³ ne contiennent que 6 milligr. 6 de phosphore soluble. Comment allons-nous séparer le phosphore phytinique du phosphore minéral dans pareille dilution ?

Si nous envisageons maintenant le phosphore nucléique, nous pouvons l'obtenir par destruction de la poudre qui reste après le traitement par l'acide chlorhydrique. Mais ce n'est pas là une méthode d'isolement de cette fraction de composés phosphorés, et puis nous sommes en présence d'un culot de près de 2 gr. 50 contenant seulement 1 milligr. 5 de phosphore. Comme nous ne pouvons introduire pour le dosage ultérieur du phosphore selon Coraux qu'une quantité limitée d'acide sulfurique (2 cm³ environ), nous serons bien embarrassés pour réaliser cette destruction.

Nous ne pouvons donc envisager dans le cas concret étudié

de doser le phosphore nucléique par destruction du culot de centrifugation. On pourrait, il est vrai, plus simplement se contenter d'évaluer le phosphore nucléique par simple différence.

Certains auteurs admettent qu'après trois heures d'agitation de la matière première avec de l'acide chlorhydrique à 1 %, la phytine et les phosphates sont passés en solution. En dosant le phosphore total de la poudre et le phosphore soluble dans une partie aliquote de la solution, on peut, par différence, déterminer le phosphore nucléique.

Si cette méthode permet d'opérer plus rapidement, puisqu'il n'est plus question ici que d'une seule extraction, elle n'est toutefois pas d'un résultat très certain. En traitant à quatre reprises différentes pendant trois heures 2 gr. 5 de poudre de lentilles délipidée par 100 cm³ d'HCl à 1,2 %, nous avons obtenu pour 100 gr. de poudre 264 milligr. de phosphore soluble, 255 milligr., 267 milligr., et 261 milligr.

En prenant les deux chiffres les plus écartés 255 et 267, comme le phosphore de la poudre délipidée était égal à 294 milligr., il s'ensuit que le phosphore nucléique sera 27 milligr., d'une part, 39 milligr. de l'autre.

Devant des résultats d'une telle imprécision, nous avons abandonné ces extractions par les acides dilués et avons étudié la technique de solubilisation des composés phosphorés au moyen de chlorure de sodium en solution.

2° EXTRACTION PAR UNE SOLUTION DE CHLORURE DE SODIUM A 12,5 % ADDITIONNÉE DE TRIACÉTIDE. — La matière première délipidée, pulvérulente et sèche, transférée dans un mortier est mélangée à la fraction de l'extract alcool-éthéré qui a refusé de se dissoudre dans l'éther-benzène. La substance est alors imprégnée d'une solution renfermant 12 gr. 50 de chlorure de sodium et 0 cm³ 5 de triacétide pour 100 cm³, faite peu de temps avant l'emploi suivant la technique donnée par MM. JAVILLIER et ALLAIRE (1931) pour l'extraction du phosphore nucléique des tissus animaux. La présence du triacétide se légitime par la nécessité d'assurer une bonne imbibition par la solution chlorurée de la matière délipidée, sèche et finement pulvérisée.

Pour 1 gr. de matière délipidée (germe de blé) ou 4 gr. (lentille), il est convenable d'employer 100 cm³ de la liqueur

chlorurée. Le tout est transféré quantitativement dans un ballon que l'on munit d'un réfrigérant à reflux; le ballon est chauffé avec précaution dans un bain d'huile jusqu'à douce ébullition de son contenu, ébullition que l'on maintient trente minutes en agitant.

La solubilisation des composés phosphorés est, dès une première extraction, largement réalisée avec les organes végétaux étudiés (germes de blé, lentilles). Il est passé en solution le *phosphore nucléo-protéidique*, le *phosphore phytinique* (pour la plus grande part), le *phosphore minéral soluble*. Il ne reste pas plus de 5 à 10 % du phosphore total de la matière initiale dans le résidu. La solution chlorurée, avec le triacétide qui permet une bonne imbibition de la poudre, aboutit ici pour l'extraction du phosphore nucléoprotéidique à un résultat aussi favorable qu'avec les tissus animaux.

L'on sépare donc la liqueur chlorurée par centrifugation. Dans 10 cm³ de celle-ci on dose, après minéralisation sulfonitrique, tout le phosphore qu'elle contient.

Nous allons séparer maintenant et doser : a) le phosphore nucléique ; b) le phosphore phytinique ; c) le phosphore minéral.

a) *Séparation et dosage du phosphore nucléique*. — Nous allons étudier la séparation et le dosage du phosphore nucléique du germe de blé. Nous commencerons par étudier la précipitation d'une quantité donnée de cette forme de phosphore, puis de quantités variables.

Notre extraction chlorurée sodique laissant 5 à 10 % du phosphore de notre poudre insolubilisé, nous allons ensuite tenter d'obtenir une solubilisation plus complète des principes immédiats phosphorés en augmentant l'acidité de notre solution extractive. Nous verrons quelle sera l'action de cette petite quantité d'acide sur les composés nucléiques.

Après avoir appris à extraire le phosphore nucléique du germe de blé, nous étudierons les conditions les meilleures d'extraction de l'acide nucléique de la poudre de lentilles.

L'ACIDE NUCLÉIQUE DU GERME DU BLÉ. — *Précipitation d'une quantité déterminée de phosphore nucléique en fonction de l'acidité* : Nous précipitons le phosphore nucléique par acidification du milieu au moyen de l'acide chlorhydrique dilué.

Le point important sur lequel M. JAVILLIER a déjà insisté au sujet de l'acide nucléique des tissus animaux est relatif à la quantité d'acide qu'il convient d'ajouter pour obtenir une précipitation quantitative : il ne faut ni perdre du produit par insuffisance de réactif, ni redissoudre partie du précipité par addition d'un excès. L'expérience montre qu'il n'est pas possible d'indiquer un volume constant de liqueur chlorhydrique.

A poids égaux, il y a beaucoup plus de phosphore nucléique dans le germe de blé que dans la graine totale de lentille et cependant il nous faut ajouter dans l'extrait aqueux beaucoup moins d'acide chlorhydrique pour obtenir tout le précipité nucléique du germe que pour obtenir tout le précipité nucléique de la graine.

Voici une expérience réalisée avec du germe de blé délipidé. Des prises de 1 gr. de poudre délipidée ont été traitées par la solution chlorurée dans les conditions préalablement décrites. Un même volume de la liqueur d'extraction (45 cm³ qui contiennent 2 milligr. 6 de P) est additionné de quantités croissantes d'acide, quantités qui sont mentionnées dans le tableau ci-après. L'isolement du précipité est fait dans quatre séries d'expériences au bout de temps croissants (trois heures, six heures, douze heures, vingt-quatre heures), ce qui doit permettre de juger tout à la fois de l'influence de la quantité d'acide et de l'influence de la durée d'action de celui-ci. Le tableau résume l'expérience.

Précipitation de 2 milligr. 6 de P. nucléique dans 45 cm³ de solution chlorurée par des quantités croissantes d'HCl.

DURÉE de la précipitation	HCl							
	11 mgr.	16 mgr.	22 mgr.	27 mgr.	55 mgr.	109 mgr.	164 mgr.	219 mgr.
heures	mgr. P.	mgr. P.	mgr. P.	mgr. P.	mgr. P.	mgr. P.	mgr. P.	mgr. P.
3	»	2,50	2,47	2,54	2,35	2,22	»	2,11
6	Traces.	2,55	2,47	»	2,38	»	2,10	1,87
12	0,62	2,59	2,59	2,54	2,43	2,29	2,03	1,64
24	0,95	2,59	2,59	2,59	2,49	2,15	1,85	1,36

L'on voit qu'il n'est pas indifférent d'ajouter plus ou moins d'acide chlorhydrique. Pour un temps de contact égal à

six heures par exemple, l'on trouve, avec des quantités croissantes d'acide, d'abord des traces seulement de phosphore nucléique précipité, puis un chiffre voisin du maximum, puis des chiffres régulièrement décroissants. Un excès d'acide minéral redissout donc du précipité. D'autre part, avec une faible dose d'acide, telle que 16 milligr. d'acide chlorhydrique, l'on obtient, avec le temps, des doses croissantes de phosphore nucléique; avec une dose dix fois plus forte, des doses décroissantes; autrement dit, l'action solubilisante et aussi sans doute hydrolysante de l'acide minéral intervient ici.

Des doses comprises entre 16 et 27 milligr. d'acide chlorhydrique, dans le cas particulier étudié, représentent des doses optima. L'on obtient, au bout de douze heures, le chiffre le plus élevé et ce chiffre se retrouve encore pour une durée double de l'action de l'acide minéral.

16 milligr. d'acide chlorhydrique représentent 0 cm³ 45 de liqueur chlorhydrique normale; 22 milligr. représentent 0 cm³ 6. Chacune de ces doses étant ajoutée dans un essai à 45 cm³ de liquide d'extraction, la première est telle que la concentration en acide chlorhydrique du liquide final est centi-normale. Il se trouve que c'est la concentration même que mentionnait M. JAVILLIER pour une tout autre matière première.

La concentration en ions H⁺ de notre liquide d'extraction additionné de cette dose optima d'acide chlorhydrique exprimée par le pH, est $\text{pH} = 2$ (détermination colorimétrique). Nous pouvons donc dire que la précipitation se fait au mieux pour le liquide d'extraction provenant du germe de blé à pH 2. Elle est encore d'ailleurs aussi complète pour la dose de 27 milligr., soit à une concentration d'acide chlorhydrique N/60.

Précipitation de quantités variables de phosphore nucléique en fonction de l'acidité : Dans l'expérience précédente, nous avons étudié une seule concentration en phosphore nucléique, soit 2 milligr. 6 pour les 45 cm³ de solution. Nous avons voulu voir comment s'opérait la précipitation en prenant des solutions de concentrations différentes.

Nous avons pris des liqueurs telles que dans nos 45 cm³ se trouvaient des quantités croissantes de phosphore nucléique : 1 milligr. 53, 3 milligr. 06 et 6 milligr. 12.

Pour cela nous avons pris tout simplement un autre germe

délipidé et nous avons traité les quantités de 0 gr. 50, 1 gr., 2 gr. par 100 cm³ de solution chlorurée dans les mêmes conditions que précédemment.

Les volumes de 45 cm³ étaient additionnés de quantités croissantes d'acide : 16, 22, 27, 35, 109, 164, 219 milligr. d'acide chlorhydrique, et le tout abandonné à la température du laboratoire pendant douze heures. L'isolement du précipité était ensuite fait comme précédemment.

Le tableau résume l'expérience :

Précipitation de quantités croissantes d'acide nucléique en fonction de l'acidité.

POIDS de la prise d'échantillon	VOLUME de solution chlorurée	POIDS de P. nucléique de 45 cm ³ de solution	HCl						
			16 mgr.	22 mgr.	27 mgr.	35 mgr.	109 mgr.	164 mgr.	219 mgr.
gr.	cm ³	mgr.							
2,5	500	1,53	1,48	1,52	1,52	1,35	1,34	1,29	»
3	500	3,06	3,02	3,04	3,06	3,00	2,88	2,84	2,79
10	500	6,12	6,22	»	6,12	»	6,30	6,00	5,90

Comme dans nos premières expériences, on voit qu'il est de la plus haute importance de bien calculer la quantité d'acide à ajouter. Les quantités comprises entre 16 et 27 milligr. semblent être les quantités optima : 16 milligr. d'acide chlorhydrique représentent 0 cm³ 45 de liqueur chlorhydrique normale, donc une concentration finale centi-normale. C'est la même concentration que nous avons donnée comme optima pour précipiter 2 milligr. 6 de phosphore nucléique.

Nous voyons donc que pour précipiter des quantités variables de phosphore nucléique : 1 milligr. 53, 2 milligr. 6, 3 milligr. 06, 6 milligr. 12, il faut une égale quantité d'acide chlorhydrique. Chaque fois il faut arriver à une acidité voisine de N/100.

L'examen du tableau nous montre encore que pour des quantités de phosphore nucléique de 1 milligr. 53 dès que l'on arrive à une concentration en HCl de 35 milligr. on voit déjà une chute sensible du phosphore nucléique (11 %). Pour une quantité de 3 milligr. 06 de phosphore nucléique il faut une concentration de 219 milligr. d'acide pour obtenir une chute

de 7 %/. Pour 6 milligr. 12 la concentration de 219 milligr. d'acide ne provoque qu'une chute de 3 %/. Avec une telle concentration tout l'acide n'est même pas ionisé, il ne peut plus être question de pH.

Comment expliquer que dans ces conditions la quantité d'acide chlorhydrique soit moins néfaste. Remarquons que dans ces deux dernières expériences, nous n'avons plus 2 gr. 5 de poudre pour 500 cm³ de solvant, mais 5 gr. et 10 gr. pour 500 cm³. La quantité de sels tampons augmente d'autant plus évidemment, mais ce n'est pas tout, car, si les tampons jouaient seuls pour empêcher la redissolution du précipité nucléique, le pH resterait constant et donc voisin de 2. Or, il ne tarde pas à atteindre pH = 1 et même à le dépasser.

Il ne faudra donc pas prendre au hasard une quantité quelconque de matière première pour une quantité donnée de solvant, mais au contraire bien proportionner ces deux facteurs. Nous résumons dans le tableau suivant quelques données qui permettront de nous fixer sur les quantités à employer.

POIDS de la prise d'échantillon en gr.	VOLUME de solution de ClNa en cm ³	P. TOTAL de la prise d'essai en milligr.	P. SOLUBLE dans la solution de ClNa en milligr.	QUANTITÉ de P. nucléique théorique en milligr.	QUANTITÉ de P. nucléique précipité en milligr.
2,50	500	49	46	17	17
5	500	98	89	34	34
10	500	196	170	68	68
20	500	392	266	136	132

Nous avons pris des doses croissantes de poudre délipidée, 2 gr. 5, 5 gr., 10 gr., 20 gr., que nous avons traitées par une même quantité de solution chlorurée : 500 cm³. Nous voyons que les quantités de P soluble vont en décroissant au fur et à mesure que l'on emploie plus de poudre.

Par contre, fait important : les quantités de phosphore nucléique demeurent constantes. Il n'est pas douteux, toutefois, que la proportion de 10 gr. de poudre pour 500 cm³ de solution ne saurait être dépassée. Avec 5 gr. de poudre et 500 cm³ de solution chlorurée, on sépare presque tout le liquide.

Avec 10 gr. et 500 cm³ de solvant, on en sépare encore les 4/5. Ensuite, avec 20 gr. de poudre pour 500 cm³ de solution, on ne sépare plus que les 3/5, les centrifugations deviennent difficiles, le fond des tubes est garni d'une épaisse couche d'amidon. *Solubilisation complète des composés phosphorés à pH = 4,8. Action néfaste de cette petite quantité d'acide sur les composés nucléo-protéidiques, leur dénaturation* : Jusqu'à présent, nous avons utilisé pour solubiliser les composés phosphorés une solution de chlorure de sodium neutre. Nous sommes arrivés à des résultats très honorables. Dans les essais les meilleurs, nous avons solubilisé les composés phosphorés à 6 % près; plus généralement à 8 et 10 % près. Ne peut-on arriver à tout solubiliser?

Cette question, nous avons essayé de la résoudre en modifiant le pH de la solution extractive.

Variations du phosphore total soluble en solution chlorurée sodique en fonction de l'acidité ionique de la solution.

P. total de la poudre de germe délipidée : P = 1 gr. 90 %.

2 gr. de germe délipidé + 100 cm³ de solution ClNa 12,5 % sont additionnés de quantités croissantes d'HCl N ou de NaOH N, le pH final de la solution est pris après ébullition de une demi-heure.

2 GR. GERME + 100 CM ³ SOLUTION ClNa A 12,5 %		
HCl N ajouté en centimètres cubes	pH final	P. trouvé %
0	5,4	1,70
0,5	5,1	1,80
1	4,8	1,87
2	3,6 < pH < 2,8	1,64
3	2,8 < pH < 2	1,87
NaOH N ajoutée en centimètres cubes	pH final	P. trouvé %
0	5,4	1,70
0,5	5,5	1,64
1	5,7	1,39
1,5	5,8	1,34

Le pH de la solution chlorurée sodique de germe de blé que l'on a fait bouillir durant une demi-heure est après refroidissement égal à 5,4. A ce moment, il y a en solution 90 à 94 % de l'ensemble des composés phosphorés. Nous avons fait varier ce pH final en deçà et au delà de 5,4. Pour cela nous avons ajouté à notre solution de ClNa avant ébullition de légères quantités d'acide chlorhydrique N ou de soude N. Les quantités de phosphore entrant en dissolution ont aussitôt varié. Le tableau de la page précédente résume l'expérience.

Action de la soude. — On voit que si on ajoute de la soude en très petite quantité dans nos expériences d'extractions chlorurées, la quantité de composés phosphorés entrant en solution n'augmente pas. Au contraire, pour un pH de 5,4 à 5,7 la quantité de composés phosphorés solubles tombe de 170 milligr. à 139 milligr. pour 100 gr. de poudre délipidée.

Action de l'acide. — Il n'en est pas de même d'ailleurs quand on passe en solution acide. Pour un pH de 4,8 tous les composés phosphorés passent en solution. La solubilité décroît ensuite jusqu'à $\text{pH} = 2,8$ où elle repasse par un maximum. Ce chiffre maximum, après un chiffre plus faible 1,64 semble aberrant. Des expériences recommencées dans les mêmes conditions aux mêmes concentrations ont cependant donné les mêmes résultats.

Il semble donc aisé de solubiliser tous les composés phosphorés, puisque pour cela il suffit de porter le pH de la liqueur extractive à 4,8.

Quel est le sort du phosphore nucléique dans cette nouvelle extraction? Puisque le pH est moins acide que celui de précipitation qui est égal à 2, le phosphore nucléique a dû vraisemblablement tout se dissoudre, et pour le précipiter, il suffira de porter le pH à 2. Dans ces conditions nous devons le retrouver exactement floclé.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons utilisé pour y précipiter le phosphore nucléique deux des solutions décrites plus haut : les solutions dont le pH final était respectivement égal à 5,4 et 4,8.

Les quantités de phosphore soluble étaient respectivement pour 2 gr. de germe mis en présence de 100 cm^3 de solution chlorurée $\text{P} = 34$ milligr. et $\text{P} = 37$ milligr. 4. 15 cm^3 de

chacune de ces solutions contenaient respectivement 5 milligr. 1 et 5 milligr. 61 de phosphore soluble. A trois portions de 15 cm³ de chacune, nous avons ajouté suffisamment d'acide chlorhydrique pour obtenir un pH voisin de 2, nous avons agité les liquides en frottant les parois et laissé douze heures au repos. Au bout de ce temps, nous avons centrifugé les précipités nucléiques, nous les avons détruits et y avons dosé le phosphore. Dans la solution extractive ordinaire, nous avons obtenu trois chiffres concordants de phosphore nucléique : 1 milligr. 90, 1 milligr. 94, 1 milligr. 90 (moyenne : 1 milligr. 91).

Dans la solution à pH = 4.8 qui tenait en dissolution tous les composés phosphorés, nous avons obtenu : 1 milligr. 18, 1 milligr. 40, 0 milligr. 84 (moyenne : 1 milligr. 14, erreur 40 %).

Pourquoi cette différence des résultats qui atteint 40 %? Dans chaque cas nous avons opéré de façon semblable, nous avons additionné nos liqueurs d'acide chlorhydrique avec la même prudence et, en ayant bien soin d'agiter, de frotter les parois pour faciliter la floculation. Pour nous, l'acide chlorhydrique initial qui a entraîné la solubilisation de la totalité des composés phosphorés a modifié, sous l'action de la chaleur, certaines propriétés de ces composés, les a dénaturés.

Cette expérience est à rapprocher de l'expérience d'Osborne (1901, 1902) sur la dénaturation des protéides par les acides. Cet auteur a montré comment variait la solubilité de l'édestine sous l'action de faibles quantités d'acides. « L'édestine cristallisée dissoute dans la plus petite quantité possible d'acide chlorhydrique est précipitée par l'addition d'un peu de chlorure de sodium. Ce précipité, traité par une solution concentrée de chlorure de sodium ne se redissout jamais entièrement. » Dans l'expérience d'Osborne, une globuline, l'édestine, traitée par une quantité très faible d'acide chlorhydrique, voit ses caractères de solubilité changer au point d'être désormais insoluble dans les solutions de sels neutres.

Dans notre expérience, des nucléoprotéides traités par une quantité très faible d'acide chlorhydrique à chaud ne précipitent plus d'une façon complète lorsqu'on additionne leur solution de la quantité théoriquement nécessaire à leur précipitation.

L'action de l'acide chlorhydrique selon Osborne n'aurait pas

fait varier la composition intime du protéide. Le dérivé devenu insoluble dans une solution saline neutre, et qu'il appelle édestane n'est pas une acide-albumine, car elle n'est pas soluble dans un léger excès de potasse.

FALK (1918) a émis l'hypothèse qu'en présence des acides, un changement tautomérique devait s'effectuer dans l'arrangement peptidique, changement tautomérique qui serait de même nature que celui réalisé par l'activité des enzymes.

FLORENCE et ENSELME (1933) ont trouvé des valeurs d'azote voisines pour l'édestine et l'édestane, les propriétés physiques, par contre, s'opposaient.

ÉTUDE DU PRÉCIPITÉ NUCLÉIQUE. — *Solubilisation à pH = 5,4. Précipitation à pH = 2.* — Nous voyons donc qu'il ne faut pas vouloir tendre vers une solubilisation complète de l'ensemble des composés phosphorés par addition d'une certaine quantité d'acide si l'on veut obtenir par la suite une précipitation totale des composés nucléo-protéidiques.

Le composé nucléique extrait du germe au moyen de la solution chlorurée neutre et précipité dans les conditions optimales d'acidité peut-il être remis en solution? *A priori*, la solution s'étant faite sans dénaturation et la précipitation ayant été obtenue avec le minimum d'acidité, il est permis de penser qu'une telle substance qui semble flocculer à un pH déterminé pourra, par une variation d'acidité, se remettre en solution et sera encore capable de flocculer.

Nous avons délipidé 10 gr. de germe. La poudre délipidée, bien pulvérisée, a été traitée par 500 cm³ de solution chlorurée. Cette solution a été centrifugée. Nous avons recueilli 400 cm³ de solution d'où nous avons précipité l'acide nucléique par 6 cm³ 6 de solution normale d'acide chlorhydrique. Le précipité a été traité de nouveau par 400 cm³ de solution chlorurée d'où nous avons essayé de le faire flocculer. Si tout le phosphore nucléique s'était dissous nous devrions avoir 3 milligr. 15 dans 45 cm³. Nous avons donc précipité des portions de 45 cm³ par des quantités croissantes d'acide chlorhydrique. Les quantités de phosphore obtenues ont été de :

0 milligr. 76 0 milligr. 95 0 milligr. 97 1 milligr. 04 1 milligr. 06.

La précipitation maxima était donc de 1 milligr. 06 au lieu de 3 milligr. 15. D'où venait ce refus de se dissoudre? Le pH de la solution chlorurée après première extraction était de 5,4 nous l'avons déjà dit. Après deuxième extraction, il n'était plus que de 2,8 à 3.

Nous avons donc recommencé l'expérience précédente. Nous avons de nouveau précipité le phosphore nucléique de 400 cm³ de solution dont 30 cm³ contenaient 2 milligr. 1, au pH optima ; le précipité recueilli a été remis en solution dans 400 cm³ de solution chlorurée, additionnée de suffisamment de soude normale (3 cm³) pour élever le pH à une valeur voisine de 5,4. Par colorimétrie, nous l'avons trouvé = 5,2. Nous avons pris des portions de 30 cm³ de cette nouvelle solution que nous avons additionnées d'HCl N. Quatre dosages successifs faits à pH voisin de 2 ont donné :

1 milligr. 97	1 milligr. 97	} Moyenne : 1 milligr. 97.
1 milligr. 95	2 milligr.	

Nous avons donc réussi à dissoudre l'acide nucléique du germe à pH = 5,4 à le précipiter quantitativement à pH = 2 à le redissoudre à pH = 5,2 et à le reprécipiter à pH = 2.

SÉPARATION ET DOSAGE DU PHOSPHORE NUCLÉIQUE. — *Cas de la Lentille. Extractions par une solution de chlorure de sodium et de triacétide. Précipitation du phosphore nucléique.* — L'étude que nous venons de poursuivre sur les composés nucléiques du germe de blé ne peut malheureusement pas se répéter sur la poudre de graines de lentilles qui ne se prête pas aussi bien à une pareille étude expérimentale.

Elle ne contient, en effet, que 10 % environ de son phosphore sous forme nucléique, tandis que la poudre de germe en contient 30 % environ. Aussi, nous sommes-nous contenté de déterminer la dose optima d'acide nécessaire pour précipiter tout le phosphore nucléique.

Les extractions étant faites sur la poudre délipidée, comme il a été décrit (4 gr. de poudre pour 100 cm³ de solution), les précipitations ont été effectuées sur des volumes constants de 75 cm³ de liqueurs extractives avec des quantités d'acide chlorhydrique s'étageant entre 53 milligr. et 529 milligr.

d'acide chlorhydrique (soit X à C gouttes d'acide titré à 25 %). Des expériences préliminaires ont montré que les faibles doses d'acide réalisant de bonnes précipitations dans les liqueurs d'extraction du germe de blé étaient absolument insuffisantes avec les liqueurs d'extraction de la graine de lentilles ; l'on a dû expérimenter avec une gamme de doses s'élevant sensiblement plus haut. Les précipités ont été recueillis au bout de douze heures. Voici les chiffres obtenus :

HCl AJOUTÉ en milligrammes	PHOSPHORE TROUVÉ en milligramme	HCl AJOUTÉ en milligrammes	PHOSPHORE TROUVÉ en milligramme
53	1,31	264	1,45
106	1,40	317	1,47
159	1,42	423	1,06
212	1,42	529	1

La précipitation est donc ici optima pour une addition d'acide chlorhydrique en quantité telle que la concentration en cet acide, s'il n'intervenait rien d'autre, serait de l'ordre de celle d'une liqueur déci-normale.

Il nous est sans doute permis de conclure dès maintenant que l'optimum de floculation et de stabilité du précipité correspond à un certain pH et qu'il sera expédient de déterminer celui-ci pour chaque matière dont on entendra faire l'étude.

De ces expériences, nous pouvons déjà tirer plusieurs conclusions :

En ce qui concerne le germe de blé : 1° Il est possible de solubiliser tous les composés phosphorés de la poudre de germe de blé délipidé, au moyen de la solution chlorurée sodique additionnée de triacétide, à condition de porter l'acidité ionique à un pH voisin de 4,8.

2° La solubilisation totale à un tel pH n'est toutefois pas à envisager comme le résultat le plus favorable à obtenir, les composés nucléiques traités ainsi à chaud précipitant mal par la suite.

3° Il apparaît comme plus rationnel de dissoudre les composés phosphorés sans addition d'acide, donc en solution chlorurée sodique neutre. Le pH final devenant d'ailleurs légèrement acide et égal à 5,4.

4° La quantité de poudre de germe délipidé à employer pour

100 cm³ de solution chlorurée sodique pourra être de 0 gr. 50, 1 gr., 2 gr., s'il s'agit d'extraire uniquement le phosphore nucléique. Si on veut faire passer en solution le maximum des autres composés phosphorés on devra se contenter de mettre 0 gr. 50 à 1 gr. en présence de 100 cm³ de solution chlorurée.

5° A cette concentration et à l'acidité indiquée, les composés phosphorés sont dissous, à 6-10 % près, mais le phosphore nucléique est dissous intégralement.

6° Les composés nucléiques dissous à pH = 5,4 peuvent être précipités quantitativement en douze heures, par addition ménagée d'acide chlorhydrique jusqu'à pH = 2.

7° Les composés nucléiques précipités à pH 2 peuvent être remis en solution à condition de les placer dans un milieu à pH = 5,4 d'où on peut encore les flocculer en ramenant le pH à 2.

En ce qui concerne la poudre de graines de lentilles : 1° On peut solubiliser à 6-10 % près les composés phosphorés en utilisant une solution chlorurée sodique neutre. Le phosphore nucléique est passé en solution.

2° La précipitation du phosphore nucléique de la poudre de lentilles réclame une plus grande quantité d'acide chlorhydrique que dans le cas du germe de blé.

3° De plus fortes quantités d'acide sont moins nuisibles que dans le cas du germe. Il est à remarquer que nous avons 4 gr. de poudre dans 100 cm³ de liquide et que nous prenons 75 cm³ de solution pour effectuer notre précipitation. Pour une telle quantité de matière dans le cas du germe l'acide deviendrait aussi moins nocif, comme nous l'avons vu.

Dès lors, la restriction faite par M. POSTERNAK en 1929 au sujet de la méthode d'extraction du phosphore nucléique de MM. JAVILLIER-ALLAIRE me semble tomber d'elle-même.

M. POSTERNAK disait : « La méthode de dosage du phosphore nucléique, proposée par M. JAVILLIER, ne paraît pas susceptible d'une application générale, avec des matières d'origine végétale (graines, germes séparés des graines, jeunes plantules), elle m'a donné des résultats paradoxaux dus à ce que l'hexaphosphate d'inosite se combine avec les protides, en milieu acide, et simule des nucléoprotéides. »

Nous avons pu montrer que les quantités de composés

nucléiques précipités pouvaient varier dans d'assez larges limites suivant les conditions qui ont présidé à leur dissolution même. Mais les conditions favorables réalisées, il nous semble que le dosage du phosphore nucléique ne doit pas trouver de résultats imprévus. Bien entendu, notre affirmation ne vaut strictement que pour les cas envisagés par nous.

La possibilité d'une précipitation par l'acide minéral d'un complexe phytino-protéidique évoquée par POSTERNAK est exclue par l'ensemble des observations réalisées ultérieurement. La recherche directe de l'inosite dans nos précipités est d'ailleurs restée négative.

b) Séparation et dosage du phosphore phytinique. — La solution chlorurée sodique d'où nous avons précipité les composés nucléo-protéidiques, a retenu les composés de la phytine et les phosphates minéraux. Nous allons d'abord nous occuper d'en séparer la phytine.

Pour déterminer la fraction de phosphore qui se trouve sous forme de composés du groupe phytine, nous avons utilisé une réaction indiquée par POSTERNAK (1903), réaction qui, comme il l'a reconnu lui-même, ne s'applique pas à la phytine seule, mais à d'autres esters phosphoriques. Elle ne s'applique, toutefois, ni aux glycéro-phosphates, ni aux phosphates : nous voulons parler de la précipitation par le chlorure ferrique en milieu acide.

Cette réaction a déjà été employée par plusieurs expérimentateurs pour un dosage volumétrique de la phytine, HEUBNER et STADLER (1914), DE TURK, HOLBERT and HOWE (1933), SOLTZ (1933), LINDENFELD (1933), etc. Je l'ai employée moi-même dès 1931. Le principe de la méthode est le suivant : Si dans une solution légèrement chlorhydrique de phytine, on laisse tomber goutte à goutte une solution de chlorure ferrique diluée, les premières gouttes disparaissent, puis la solution prend un aspect opalescent et bientôt l'on voit apparaître un précipité colloïdal blanc jaunâtre. Si l'on a eu soin d'ajouter quelques gouttes de solution de sulfo-cyanate d'ammonium, le terme de la réaction est indiqué par un changement de teinte dû à la formation de sulfo-cyanate ferrique.

Le précipité de phytinate de fer, qui est colloïdal et légère-

ment jaunâtre, ne floccule pas facilement. La fin de la réaction est, de ce fait, assez difficile à percevoir.

Si l'on doit effectuer le dosage de la phytine dans des végétaux, les bouillons sont bien souvent colorés en jaune et, comme le rapporte RATHER (1917), il devient assez difficile de s'apercevoir de la fin de la réaction. Aussi, au lieu de baser le dosage sur ce changement de teinte, et de faire un titrage volumétrique avons-nous préféré précipiter complètement la phytine par un excès de perchlorure de fer. Le précipité est séparé par centrifugation, minéralisé par le mélange sulfonitrique et, dans la liqueur, nous dosons le phosphore par la méthode de COPAUX. Nous avons ainsi le phosphore phytinique.

Le principe de la méthode étant donné, voyons quelles seront les conditions optima de précipitation de la phytine par le perchlorure de fer.

Nous employons une solution diluée de chlorure ferrique : solution de perchlorure de fer officinal $d = 1,26$ 2 cm³ 5, acide chlorhydrique $d = 1,17$ 1 cm³ — H²O quantité suffisante pour 1.000 cm³.

Précipitation de la phytine par le perchlorure de fer en milieu neutre, acétique, chlorhydrique, trichloracétique.

Nous prenons 2 gr. de phytine calcico-magnésienne que nous dissolvons dans 1.000 cm³ d'eau distillée à l'aide de la quantité juste suffisante de solution d'acide chlorhydrique de densité $= 1,17$ (1 cm³ 5 environ). 5 cm³ de cette solution de phytine détruits par le mélange sulfo-nitrique, ont donné par la méthode de COPAUX : 1 milligr. 87 de phosphore.

Précipitation par le perchlorure de fer à froid. — Si à 5 cm. de cette solution on ajoute 5 cm³ d'eau et goutte à goutte de la solution de perchlorure de fer à froid, on voit un précipité se faire. Le précipité centrifugé, comme il est dit plus haut, et minéralisé a donné comme chiffre de phosphore :

CHIFFRE THÉORIQUE en milligramme	CHIFFRE TROUVÉ en milligramme
1,87	1
1,87	1

Précipitation par le perchlorure à chaud. — Si au lieu d'opérer à froid on porte la liqueur à l'ébullition et qu'on y laisse tomber

goutte à goutte le perchlorure de fer, en ayant bien soin de frotter les parois, jusqu'à coloration rouge donnée par le sulfo-cyanate, qu'on fasse bouillir encore et maintienne la coloration par une nouvelle addition de sel ferrique, on obtient une meilleure précipitation. On obtient au lieu de 1 milligr. 87 :

1 milligr. 78 1 milligr. 76 1 milligr. 73 1 milligr. 85
1 milligr. 80 1 milligr. 80 1 milligr. 78

La moyenne égale 1,78. On a donc réussi à précipiter par un sel de fer des quantités de phosphore phytinique de l'ordre de 2 milligr. à 5 %. près.

Précipitation en présence de chlorure de sodium à chaud. — L'on peut d'ailleurs, améliorer ce dosage en effectuant la précipitation du phytinate ferrique dans un milieu salin. En ajoutant 5 % de chlorure de sodium au milieu, l'on a trouvé :

Solution de phytine à 0 gr. 374 de phosphore pour 1.000.

PRISE D'ESSAI en centimètres cubes	PHOSPHORE THÉORIQUE en milligrammes	PHOSPHORE TROUVÉ en milligrammes	ERREUR %
5	1,87	1,85	— 1
5	1,87	1,85	— 1
5	1,87	1,85	— 1
2	0,75	0,72	— 4
2	0,75	0,72	— 4

On peut donc obtenir de bonnes précipitations de phytine par le perchlorure de fer versé goutte à goutte si l'on travaille à l'ébullition en présence de chlorure de sodium et si l'on frotte énergiquement les parois. Si l'on s'écarte un peu de ces règles, on s'aperçoit que les dosages sont moins bons.

Précipitation en milieu acétique à froid. — Nous avons voulu voir si la précipitation par le perchlorure de fer à froid en milieu acétique était complète. Pour cela, nous avons pris 5 cm³ de notre solution chlorhydrique de phytine que nous avons additionnés de III gouttes de rouge de méthyle, puis nous avons alcalinisé par l'ammoniaque jusqu'au jaune (pH 6). La phytine a précipité. Nous l'avons remise en solution par

quelques gouttes d'acide acétique jusqu'à virage au rose de l'indicateur (pH 4,4). A ce moment, nous avons ajouté le perchlorure de fer dans les mêmes conditions que plus haut. Le précipité a été centrifugé et le phosphore dosé. On a trouvé non plus 1 milligr. 87, mais : 1 milligr. 65 et 1 milligr. 65.

Précipitation en milieu acétique à chaud additionné d'acétate de sodium. — On sait que l'acétate de sodium, en présence de perchlorure de fer, donne de l'acétate ferrique qui s'hydrolyse à chaud en donnant de l'hydrate de fer et de l'acide acétique. Nous avons pensé que cet hydrate de fer, en précipitant, aiderait à l'entraînement du précipité de phytinate de fer.

Nous avons donc d'abord procédé comme pour la précipitation à froid. Il s'est produit un précipité chamois de phytinate de fer, l'acétate de fer formé parallèlement restant en solution. En portant à l'ébullition, on ne tarde pas à voir le précipité chamois s'additionner d'un précipité ocre d'hydrate de fer. Celui-ci apparaît donc après la précipitation du phytinate de fer et, par sa seule présence, il indique la fin de la réaction.

Nous avons pris une solution de phytine, telle que 5 cm³ = 1 milligr. 95 de phosphore. Nous l'avons additionnée de quantités déterminées d'acétate de sodium et d'acide acétique. Le tableau suivant résume l'expérience.

SOLUTION de phytine 5 cm ³ = 1 milligr. 95 en cm	SOLUTION d'acétate de sodium 20 % ajoutée en cm ³	SOLUTION d'acide acétique 10 % en cm ³	CHIFFRE théorique en milligr.	CHIFFRE trouvé en milligr.	ERREUR %
5	2,5	1	1,95	1,93	— 1
5	2,5	1,5	1,95	1,92	— 1,5
5	0,5	1	1,95	1,94	— 0,5
5	0,5	1	1,95	1,96	+ 0,5
5	0,5	1	1,95	1,93	— 1

Précipitation en milieu acétique à chaud sans acétate de sodium. — Dans une autre opération, nous avons omis de mettre de l'acétate.

La précipitation a été moins bonne comme l'indique le tableau suivant :

SOLUTION de phytine 5 cm ³ = 1 milligr. 95 en cm ³	SOLUTION d'acide acétique 10 % en cm ³	CHIFFRE théorique en milligr.	CHIFFRE trouvé en milligr.	ERREUR %
5	1	1,95	1,68	— 14
5	1	1,95	1,64	— 15

Précipitation en milieu acétique à chaud additionné d'acétate de sodium et d'acide tartrique. — L'acétate de sodium a donc favorisé la précipitation du phytinate de fer puisqu'en son absence la précipitation est moins bonne. Que deviendrait la précipitation si on empêchait la formation d'hydrate ferrique en ajoutant à notre milieu un corps comme l'acide tartrique, par exemple? Nous avons ajouté à 5 cm³ de solution de phytine précédente, 0 cm³ 5 d'acétate de sodium à 20 %, 1 cm³ d'acide acétique à 10 % et 1 cm³ d'acide tartrique à 10 %. Nous avons obtenu les chiffres suivants :

SOLUTION de phytine 5 cm ³ = 1 milligr. 95 en centimètres cubes	SOLUTION d'acide acétique 10 % en centimètre cube	SOLUTION d'acétate de sodium 20 % en centimètre cube	SOLUTION d'acide tartrique 10 % en centimètre cube	CHIFFRE THÉORIQUE en milligramme P.	CHIFFRE TROUVÉ en milligramme P.	ERREUR %
5	1	0.5	1	1,95	1,82	— 6
5	1	0.5	1	1,95	1,90	— 2,5

Nous voyons qu'en empêchant la précipitation de l'hydrate ferrique par addition d'acide tartrique la phytine ne précipite pas complètement. La précipitation est toutefois meilleure qu'en l'absence d'acétate de sodium. Ce dernier sel agit donc dans la solution par un autre effet que celui de s'hydrolyser. Il favorise vraisemblablement encore la précipitation par son rôle d'électrolyte. En résumé, il résulte des expériences précédentes qu'en présence d'acétate de sodium à l'ébullition on peut obtenir une précipitation complète de la phytine.

Précipitation de la phytine en présence de phosphore minéral.

— Malheureusement chacun sait que si une solution de phosphates alcalins additionnée d'acétate de sodium et de perchlorure de fer est portée à l'ébullition, il se forme, en même temps que l'acétate basique de fer, du phosphate ferrique qui est insoluble dans l'acide acétique. Nous ne pourrions donc précipiter notre phytine en milieu acéto-acétique par le perchlorure de fer quand nous serons en présence de phosphore minéral. Il nous faudra opérer la précipitation de la phytine en milieu chlorhydrique, comme nous l'exposons au début de ce chapitre.

Le problème se complique singulièrement si l'on songe que le phytinate ferrique qui est un colloïde entraînera inévitablement dans sa précipitation une partie du phosphore minéral qui sera adsorbé. On sait en effet quel pouvoir d'adsorption possède un autre colloïde du fer, l'hydrate ferrique.

Notre phytinate de fer adsorbera de même une partie des phosphates qui seront en solution.

Afin de limiter le plus possible les effets de l'adsorption nous opérerons notre précipitation en milieu chlorhydrique sans toutefois dépasser une certaine acidité qui pourrait empêcher notre phytine de précipiter totalement. Voyons quel sera l'optimum d'acidité à réaliser.

Pour cela, à des portions de 25 cm³ de solution contenant 1 milligr. 93 de phosphore phytinique et 2 milligr. 05 de phosphore minéral, nous ajoutons des quantités croissantes d'acide chlorhydrique : 16 milligr., 32 milligr., 64 milligr., 96 milligr. HCl et nous précipitons la phytine par le perchlorure de fer en présence de sulfocyanate d'ammonium en suivant les détails donnés plus haut. Les précipités de phytinate ferrique sont minéralisés et le phosphore est dosé. Les résultats sont exposés dans le tableau suivant :

QUANTITÉ D'HCl ajoutée à 15 centimètres cubes de solution en milligrammes	PHOSPHORE PHYTIQUE ajouté en milligramme	PHOSPHORE PHYTIQUE trouvé en milligrammes
16.	1,95	2,41
32.	1,95	2,34
64.	1,95	2,40
96.	1,95	1,99

Quand on voudra doser la phytine en présence de phosphates il faudra opérer la précipitation en milieu d'acidité judicieusement calculée afin d'éviter l'adsorption des phosphates par le phytinate ferrique colloïdal.

Précipitation de la phytine en milieu trichloracétique par le perchlorure de fer. — Ayant eu à opérer certaines extractions de poudres de graines par de l'acide trichloracétique nous avons été amené à nous demander quelle action pouvait exercer cet acide sur la précipitation du phytinate ferrique.

Nous savons que les phosphates ne précipitent pas par le perchlorure de fer à froid en milieu trichloracétique; par contre la phytine précipite quantitativement.

En prenant 5 cm³ de solution de phytine contenant 1 milligr. 95 de phosphore phytinique, l'additionnant de 1 cm³ de solution d'acide trichloracétique à 20 % et nous mettant au pH optimum de précipitation en présence de rouge de méthyle, comme nous l'avons indiqué plus haut, nous obtenons une bonne précipitation de phytinate ferrique. Au lieu de 1 milligr. 95 nous obtenons dans deux opérations successives 1 milligr. 95 et 1 milligr. 90 soit une erreur moyenne de 1,25 % environ.

La précipitation en milieu acétique faite dans les mêmes conditions est moins bonne puisque au lieu de 1 milligr. 87 on trouve 1 milligr. 65 comme nous l'avons vu plus haut.

Nous croyons avoir dans la précipitation de la phytine par le perchlorure de fer en milieu trichloracétique le procédé de choix pour précipiter ce composé phosphoré.

Précipitation de la phytine par l'acétate de cuivre. — Pour compléter cette étude de la précipitation de la phytine, il nous faut dire un mot de la précipitation par l'acétate de cuivre, procédé que nous avons vu utiliser par POSTERNAK (1903) pour isoler la phytine des graines oléagineuses et aussi par BERNARDINI et MORELLI (1912) à l'occasion d'une étude sur la germination du froment.

Comme le fait observer KOEHLER (1926) dans son premier mémoire sur « les composés phosphorés des plantes », cette méthode peut précipiter des corps phosphorés autres que la phytine.

Nous nous sommes rendu compte que des glycérophosphates

laissés en contact avec l'acétate de cuivre donnent un sel insoluble. Mais nous n'avons pas vérifié l'action de l'acétate de cuivre sur les autres esters phosphoriques.

Nous avons toutefois essayé de précipiter la phytine au moyen de ce sel. Nous avons pu nous rendre compte que la précipitation était totale à froid.

Nous aurions eu de ce fait une méthode de dosage de la phytine si d'autres esters phosphoriques n'avaient pas été précipités aussi par ce composé.

De l'étude des différentes précipitations de la phytine envisagées nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

1° La phytine précipite mal par le perchlorure de fer à froid, même en milieu neutre.

2° La phytine précipite bien par le perchlorure de fer à chaud, surtout en présence d'acétate de sodium, à condition de frotter énergiquement les parois du vase et de verser le perchlorure goutte à goutte.

3° La présence simultanée de la phytine et d'un phosphate rendant impossible l'utilisation de l'acétate, il faut opérer en milieu chlorhydrique.

4° La méthode de choix pour précipiter la phytine est la précipitation par le perchlorure de fer en milieu trichloracétique à froid en présence de rouge de méthyle à $\text{pH} = 5$ en faisant suivre la précipitation d'un lavage par quelques centimètres cubes d' HCl $\text{N}/10$.

5° La précipitation par l'acétate de cuivre ne peut être utilisée dans un milieu où peuvent se trouver d'autres esters phosphoriques. Elle sera utilisable dans le cas où on saura être en présence de phytine et de phosphates minéraux seulement.

c) *Phosphore minéral. Séparation et dosage.* — Nous venons de voir comment on peut précipiter la phytine en présence de phosphore minéral. Le problème inverse, la séparation des phosphates et leur dosage en présence de la phytine nous arrêtera un moment.

Précipitation des phosphates en présence de la phytine par la liqueur magnésienne — Nous examinerons 3 cas :

1° Précipitation en liqueur pure contenant seulement un phosphate et de la phytine

2° Précipitation en liqueur chlorurée sodique d'extraction d'une poudre de graines.

3° Précipitation en liqueur trichloracétique d'extraction d'une poudre de graines.

1° *Précipitation en liqueur pure.* — Pour doser les phosphates minéraux une des techniques les plus précises est la précipitation par la liqueur magnésienne. Cette méthode qui donne de bons résultats pour les macrodosages donne encore satisfaction pour des quantités de l'ordre du milligramme et même en dessous.

Dans une solution pure de phosphate disodique nous avons dosé des quantités de phosphore comprises entre 1/2 milligr. et 1 milligr. 5 avec une bonne approximation en précipitant l'acide phosphorique par la liqueur magnésienne. A 1 cm³ de solution de phosphate placé dans un tube à centrifuger, nous avons ajouté 1 cm³ des trois solutions suivantes : chlorure de magnésium à 1/20, chlorure d'ammonium à 1/10, ammoniaque, et 6 cm³ d'eau. Nous avons agité sans toucher les parois, abandonné une demi-heure à 50°-60° puis après refroidissement centrifugé. Nous avons lavé avec 4 à 5 cm³ d'alcool à 50°, puis nous avons dissous le précipité dans 10 cm³ de solution sulfurique à 20 % et dosé suivant COPAUX. Ainsi nous avons trouvé pour :

1 milligr. 12 de phosphore : 1 milligr. 15 et 1 milligr. 12
0 milligr. 56 de phosphore : 0 milligr. 56 et 0 milligr. 55

En présence de phytine, on pourrait craindre que la méthode ne fût pas applicable car la phytine précipite aussi par la solution magnésienne. Mais il n'en est rien. La phytine précipite, en effet, et le précipité est soluble dans la solution sulfurique mais ne réagit pas devant les réactifs de la méthode de COPAUX.

On peut donc doser les phosphates en présence de phytine par la liqueur magnésienne. Nous recommandons toutefois de porter une demi-heure à l'ébullition au lieu de chauffer seulement à 50°-60°. De cette façon, nous avons obtenu en milligrammes :

CHIFFRES THÉORIQUES

1,60
3,20
3,20
3,20

CHIFFRES TROUVÉS

1,59
3,17
3,20
3,24

On peut d'ailleurs doser le phosphore minéral en présence de phytine par la méthode de COPAUX sans passer par le phosphate ammoniaco-magnésien. On sait que si on mélange un phosphate et de la phytine dans une ampoule de COPAUX, seul le phosphate réagit et donne le complexe; la phytine reste dans ce cas indifférente.

2° Précipitation en liqueur chlorurée sodique. Séparation préalable des substances protéiques. — Dans les liqueurs chlorurées sodiques d'extraction des graines, il passe en solution des protéides et des glucides, rendant les solutions visqueuses. Ces corps demeurent en solution après la précipitation des composés nucléoprotidiques. Avant de tenter la précipitation des phosphates, nous avons donc voulu nous débarrasser de ces albumines soit par un déféquant, soit en les adsorbant par de la terre à foulon, soit en les éliminant par ultra-filtration.

Action de l'acide trichloracétique. — L'acide trichloracétique précipite une partie de ces albumines, mais pas en totalité. Une précipitation ammoniaco-magnésienne dans une solution ainsi déféquée donne un coagulum qui n'a rien de cristallin comme doit être un précipité de phosphate ammoniaco-magnésien.

Action de la terre d'infusoires. — Avant tout, nous avons voulu voir si la terre d'infusoires n'allait pas entraîner une partie des phosphates ou de la phytine. A cet effet, nous avons laissé en contact, vingt-quatre heures, 50 cm³ de solution de phosphate et 5 gr. de terre d'infusoires. Au bout de ce temps, nous avons dosé le phosphore sur 5 cm³ de solution. Nous avons trouvé :

CHIFFRES THÉORIQUES en milligrammes	CHIFFRES TROUVÉS en milligrammes
2,80	2,75
»	2,80
3,30	3,20

La terre d'infusoires n'adsorbe donc pas les phosphates minéraux.

Nous avons recommencé l'expérience avec de la phytine. Nous avons laissé vingt-quatre heures en contact 50 cm³ de solution de phytine avec 5 gr. de terre d'infusoires. Au bout

de ce temps, nous avons filtré (la solution filtre rapidement), éliminé la silice dissoute et dosé le phosphore sur une partie aliquote. Nous avons trouvé :

CHIFFRES THÉORIQUES en milligrammes	CHIFFRES TROUVÉS en milligrammes
3,12	2,40
3,12	2,38

Nous avons refait l'expérience en employant 1 gr. de terre d'infusoires au lieu de 5, pour la même quantité de liquide. Nous avons trouvé :

CHIFFRE THÉORIQUE en milligrammes	CHIFFRE TROUVÉ en milligrammes
2,28	2,25

La terre d'infusoires employée à certaines doses adsorbe de la phytine ; à dose moindre, son action est réduite à peu de chose.

Malheureusement, comme on peut s'en rendre compte en ajoutant de l'acide trichloracétique dans la solution filtrée, toutes les albumines ne sont pas non plus retenues par ce procédé.

Filtration à travers les membranes en collodion. — Nous avons essayé l'effet des membranes filtrantes qui donnent des résultats si heureux pour d'autres milieux, par exemple pour le sérum sanguin. Nous avons d'abord essayé d'ultrafiltrer une solution contenant uniquement de la phytine et un phosphate,

La solution contenait 0 milligr. 56 de phosphore minéral par centimètre cube et 0 milligr. 36 de phosphore phytinique. Nous avons ultrafiltré une partie de ce liquide à travers des sacs de collodion très épais, en nous aidant de la pression d'azote. Sur des portions de 5 cm³, nous avons dosé le phosphore minéral en traitant la solution directement dans l'ampoule de COPAUX. Le phosphore total a été obtenu après minéralisation préalable. Nous avons trouvé comme phosphore minéral, pour 5 cm³, 2 milligr. 87 au lieu de 2 milligr. 80 et comme phosphore total 4 milligr. 56 au lieu de 4 milligr. 60. Par différence, nous avons obtenu le chiffre de phytine : soit 1 milligr. 69 au lieu de 1 milligr. 80.

Nous voyons donc que la phytine et le phosphore minéral se trouvent à la même concentration de part et d'autre de la membrane ultra-filtrante. Ils passent l'un et l'autre avec une vitesse égale.

Un essai semblable a été fait non plus avec des solutions pures de phosphates et de phytine, mais avec un extrait légèrement chlorhydrique de poudre de graines de lentilles. Malheureusement, la solution qui passait à travers la membrane contenait encore une trace de matière protéique, ce qui rendait impossible toute précipitation ammoniac-magnésienne et tout dosage direct par la méthode de COPAUX.

Nous avons dû renoncer à précipiter le phosphore minéral par la liqueur magnésienne dans cette solution chlorurée.

3° *Précipitation en liqueur trichloracétique.* — Si la précipitation des phosphates se fait difficilement par la liqueur magnésienne en solution chlorurée sodique d'extraction, elle pourra se faire en liqueur d'extraction trichloracétique. Ici, les albumines n'auront pas passé en solution et nous n'aurons pas à les éliminer.

Nous avons traité 1 gr. de germe délipidé par 50 cm³ d'acide trichloracétique à 10 %. Sur 20 cm³, que nous avons précipités par la liqueur magnésienne, nous avons obtenu dans deux opérations successives :

P. minéral : 4 milligr. 04 et 1 milligr. 05.

A deux autres portions de 20 cm³, nous avons ajouté 0 milligr. 80 de phosphore minéral avant toute précipitation. Ceci, afin de voir si la précipitation pouvait être considérée comme totale dans les conditions de l'expérience. Nous avons trouvé cette fois par précipitation par la liqueur magnésienne :

P. minéral : 4 milligr. 78 et 1 milligr. 78.

La différence entre les deux séries de dosage 1,78 — 1,04 = 0,74 représente donc la fraction qui a été ajoutée. Nous obtenons une approximation qui, sans être parfaite, est néanmoins satisfaisante pour de si petites quantités de phosphore dosées.

Précipitation des phosphates à l'état de phosphate ferrique. — Nous avons vu plus haut comment, lorsque nous précipitions

la phytine par le chlorure ferrique en présence d'acétate de sodium, les phosphates précipitaient eux aussi sous forme de phosphate ferrique. Ceci nous a amené à opérer notre précipitation de phytine en milieu légèrement chlorhydrique.

Si, après avoir précipité la phytine en milieu chlorhydrique à chaud par le chlorure ferrique, on ajoute Q. S. d'acétate de sodium et si l'on porte et maintient à l'ébullition, on voit le phosphate ferrique précipiter à son tour. Il suffit de le centrifuger, de le dissoudre dans l'acide sulfurique et de le doser directement par la méthode de COPAUX. Au cas où quelques impuretés précipiteraient encore qui gêneraient un dosage immédiat, il suffirait d'opérer une rapide destruction. De la sorte, on obtiendrait la séparation d'un complexe absolument pur.

Reprenons donc l'expérience que nous avons relatée à propos du dosage de la phytine en présence des phosphates en milieu d'acidité chlorhydrique croissante. En regard des chiffres de phytine trouvés, nous indiquerons les chiffres de phosphates précipités après l'addition d'acétate de sodium. Les résultats sont consignés dans le tableau suivant.

Précipitation de la phytine et des phosphates par le chlorure ferrique en présence de quantités croissantes d'acide chlorhydrique.

QUANTITÉ d'HCl en milligr.	PHOSPHORE phytinique ajouté en milligr.	PHOSPHORE minéral ajouté en milligr.	PHOSPHORE phytinique trouvé en milligr.	PHOSPHORE minéral trouvé en milligr.
16	1,95	2	2,44	1,67
32	1,95	2	2,34	1,64
64	1,95	2	2,10	1,83
96	1,95	2	1,99	1,88

En opérant en milieu d'acidité chlorhydrique bien déterminée, on peut donc éviter l'adsorption des phosphates par le phytinate de fer et par la suite retrouver le phosphate d'une façon tout à fait satisfaisante pour nos expériences physiologiques.

Nous avons voulu appliquer cette précipitation des phosphates par le chlorure ferrique en présence d'acétate de sodium

au cas de la poudre de lentilles. Dans notre extraction chlorurée, nous avons d'abord précipité la phytine, ce qui a été chose facile. Nous avons ensuite additionné notre solution de quantité suffisante d'acétate de sodium et fait bouillir. Rien n'a précipité. S'il n'y a pas de phosphates minéraux dans ce milieu, n'y a-t-il vraiment pas trace de phosphore minéral dans la graine étudiée?

Comme nous l'avons fait auparavant pour le germe de blé, nous avons alors fait une extraction de la poudre délipidée par l'acide trichloracétique au 1/10. Nous avons obtenu une solution dans laquelle nous avons pu mettre en évidence une trace de phosphore minéral.

Nous considérons comme phosphore organique et nommons phosphore organique indéterminé le phosphore qui, après séparation du phosphore nucléique et du phosphore phytinique, ne donne pas lieu à précipité dans des conditions où l'acide phosphorique doit précipiter normalement.

CHAPITRE III

RÉSULTATS OBTENUS DANS L'APPLICATION DE NOS MÉTHODES A L'EXTRACTION DES COMPOSÉS PHOSPHORÉS : DU GERME DE BLÉ, DE LA GRAINE DE LENTILLE, DE LA GRAINE DE TOURNESOL

I. — PRINCIPES IMMÉDIATS PHOSPHORÉS DU GERME DE BLÉ, DE LA GRAINE DE LENTILLE.

Notre étude technique ayant été faite à l'aide du germe de blé et de la graine de lentille, nous allons donner dans ce chapitre les valeurs des différents principes immédiats phosphorés trouvés dans ces matières premières. Avant de donner les résultats de nos analyses, rappelons brièvement le processus des expériences.

Extraction du phosphore lipidique. — Un poids convenable (10 gr.) de matière première est épuisé au Kumagawa pendant douze heures dans le cas de la lentille⁽¹⁾, deux heures dans le cas du germe de blé, par de l'alcool à 95°, puis pendant deux heures par de l'éther. L'alcool d'extraction additionné de l'éther ou une partie aliquote de l'un et de l'autre est distillé sous pression réduite ; le résidu desséché par l'alcool absolu est repris par l'éther anhydre au bain-marie, puis par le benzène.

La partie soluble dans l'éther-benzène constitue l'extrait lipoïdique. Cet extrait, obtenu après distillation des solvants, est minéralisé par le mélange sulfo-nitrique et le phosphore est dosé selon la méthode de COPAUX.

1. La matière première était représentée par des lentilles réduites à l'état de farine fine par un procédé industriel.

Extraction des autres composés phosphorés par la solution chlorurée sodique. — La poudre délipidée, desséchée (*) [1 gr. de germe ou 4 gr. de lentilles] est délayée dans la solution de chlorure additionnée de triacétide et l'épuisement est fait par ébullition d'une demi-heure dans un ballon muni d'un réfrigérant à reflux. Après refroidissement, la liqueur est séparée de la portion insoluble par centrifugation.

Phosphore soluble total. — 40 cm³ de la liqueur sont évaporés, minéralisés en vue du dosage du phosphore soluble total.

Dosage du phosphore nucléique. — Des portions de 30 cm³ de solution chlorurée dans le cas du germe de blé ou des portions de 75 cm³ dans le cas de la poudre de lentilles sont additionnées respectivement de 22 milligr. d'HCl et de 260 milligr. et laissées en contact pendant douze heures. Au bout de ce temps, le précipité formé est centrifugé, minéralisé et le phosphore est dosé selon la méthode de COPAUX.

Dosage du phosphore phytinique. — La liqueur restant après précipitation du phosphore nucléique est ramenée à une acidité voisine de pH 5 en présence de rouge de méthyle et portée à l'ébullition en présence de sulfocyanate d'ammonium. La phytine est précipitée par addition de quantité suffisante de solution de chlorure ferrique. Le précipité recueilli est minéralisé après centrifugation et lavage avec 5 cm³ d'HCl N/40 (*).

Phosphore minéral et phosphore organique indéterminé. — Nous baptisons ainsi la différence phosphore soluble total — phosphore nucléique + phosphore phytinique).

1. A laquelle on a eu soin d'ajouter la fraction de l'extrait alcoolique non soluble dans l'éther-benzène correspondant à la prise de poudre délipidée.

2. Dans nos graines la précipitation de la phytine pourrait peut-être se compliquer du fait de la présence de petites quantités d'autres composés phosphorés, tels que des nucléotides, qui n'auraient pas précipité par HCl au cours du dosage des composés d'ordre plus élevé que sont les acides nucléiques et qui seraient précipités par le chlorure ferrique.

Pour nous en rendre compte, nous avons hydrolysé 5 gr. d'acide nucléique jusqu'au stade nucléotides par la méthode de LEVENE (1920) [NH³ à 1 % à 100° pendant une heure et demie].

Après ce traitement, la solution ne précipitait plus par addition d'acide chlorhydrique.

Dans cette solution concentrée, le chlorure ferrique donnait un précipité. Mais, si on prend soin de diluer la solution, de façon à se placer dans les conditions de concentration qui sont les conditions habituelles de précipitation des composés nucléiques et phytiniques de nos organes (c'est-à-dire 2 à 3 milligr. de P dans 15 cm³ de solution), on peut se rendre compte qu'il ne se produit plus aucun précipité.

Nous admettons à la suite de cette expérience que, dans le cas de nos matières premières, la précipitation de la phytine par un sel de fer n'entraîne pas la précipitation de nucléotides.

Les tableaux ci-joints nous donnent les valeurs des différentes formes de phosphore existant dans la poudre de graines de lentilles et dans le germe de blé.

I. — Composés phosphorés de la graine de lentilles.

	°/° Humide en gr.	°/° Sec en gr.	°/° du P. total
Phosphore total de la graine	0,337	0,381	»
Phosphore lipidique	0,041	0,046	12,07
Phosphore nucléique	0,038	0,043	11,02
Phosphore phytinique	0,170	0,192	50,40
Phosphore restant (minéral et organique indéterminé).	0,088	0,100	26,22

Ce tableau nous montre que la poudre de lentilles contient 0 gr. 381 de phosphore total pour 100 gr. de substance sèche.

Dans cette quantité de phosphore total :

Le phosphore lipidique entre pour 12 °/°, soit 0 gr. 046 pour 100 gr. de substance sèche;

Le phosphore nucléique est représenté par 11 °/° du phosphore total,

II. — Composés phosphorés du germe de blé.

	°/° Humide en gr.	°/° Sec en gr.	°/° du P. total
Phosphore total du germe	1,200	1,356	»
Phosphore lipidique	0,106	0,120	8,85
Phosphore nucléique	0,336	0,379	27,95
Phosphore phytinique	0,502	0,567	41,81
Phosphore restant (minéral et organique indéterminé).	0,256	0,289	21,31

phore total, soit 0 gr. 043 pour 100 gr. de substance sèche;

Le phosphore phytinique précipitable par le chlorure ferrique compte pour 50 °/° du phosphore, soit 0 gr. 192 pour 100 gr. de substance.

Le reste des composés, soit 26 °/° environ, se trouvant sous

forme minérale et sous une ou des formes organiques indéterminées.

Le germe de blé (1) est, comme on le voit, et comme on ne l'ignorait pas, du reste, très riche en phosphore. Il contient 1 gr. 35 de phosphore total pour 100 gr. de substance sèche.

Ce phosphore se répartit pour 9 % dans ses lipides, soit 0 gr. 120 environ pour 100 gr. de substance sèche.

Le phosphore nucléique atteint ici près de 28 % du phosphore total, soit 0 gr. 379 pour 100 gr. de substance sèche,

Le phosphore phytinique, comme pour la lentille, comprend la plus grande partie du phosphore du germe 42 %, soit 0 gr. 567 pour 100 gr. de substance sèche, le phosphore restant, soit 21 %, étant sous forme minérale ou sous formes organiques indéterminées.

Extraction des composés phosphorés d'un second échantillon de germe de blé. Les composés phosphorés insolubles dans le chlorure de sodium à 12 %. — Nous avons vu plus haut, à l'occasion des extractions des poudres délipidées de lentille ou de germe de blé par le chlorure de sodium à 12 %, que les composés phosphorés ne passaient pas de façon tout à fait totale en solution. Il demeurait dans la poudre 5 % de phosphore insoluble, parfois même 10 %.

Nous avons voulu voir de quelle nature était ce phosphore insoluble. S'il s'était trouvé nucléique et avait résulté d'une déficience dans l'extraction de cette forme de phosphore, il y eût eu là une source d'erreur. Il était donc de première importance de savoir à quelle forme de phosphore attribuer la fraction insoluble.

A cet effet, nous avons fait suivre notre première extraction de 1 gr. de germe délipidé par 100 cm³ de solution chlorurée, d'une deuxième extraction par 50 cm³ de solution chlorurée nouvelle dans les mêmes conditions. La première extraction nous permit d'extraire 92 cm³ de liquide d'extraction à pH 5,4 la deuxième nous permit d'extraire 48 cm³ à pH 5,2.

1. On sait depuis fort longtemps que les embryons sont beaucoup plus riches en composés phosphorés que le reste de la graine. VORBRUDT le montrait en 1910 sur la graine de maïs. BERNARDINI sur l'embryon de riz en 1912. Tout récemment, Gabriel BERTRAND et L. SILBERSTEIN (1933), à l'occasion d'un travail de plus vaste portée, ont trouvé pour le germe de blé la teneur de 1,295 % de matière sèche, la farine, à 68,2 d'extraction titrant seulement, 0,183 %.

Nos deux solutions rassemblées formaient donc 140 cm³. Il restait dans la poudre, constituant le culot de centrifugation, 5 cm³ de liquide. Les 140 cm³ de solution extractive contenaient 18 milligr. 2 de phosphore soluble. Le culot de centrifugation détruit contenait 0 milligr. 9 de phosphore. Comme les 5 cm³ de liquide inclus renfermaient environ 0 milligr. 1, il restait donc d'insoluble 0 milligr. 8 pour 19 milligr. de phosphore total que contenait la poudre.

Une première extraction laissait 10 % du phosphore total insolubilisé, une deuxième extraction en laissait encore 0 milligr. 8 pour 18 milligr. 2, soit environ 4 %.

Sur la solution, nous avons dosé les composés nucléiques, nous les avons trouvés de même valeur que lorsque nous opérions une seule extraction. Les chiffres de phosphore phytinique ont été plus élevés de 3 %.

Nous ne pouvons arriver à une extraction totale des composés phosphorés au moyen d'un deuxième lavage de notre poudre. Ce qui est certain, c'est que dès la première extraction la totalité des composés nucléiques est passée en solution.

Aussi, dans l'étude d'un nouveau germe, avons-nous conservé l'extraction du phosphore nucléique au moyen de la solution chlorurée additionnée de triacétide. Mais nous n'avons pas précipité la phytine dans cette solution chlorurée sodique.

Nous avons extrait la phytine et les phosphates au moyen d'une solution d'acide trichloracétique à 10 %. Nous avons opéré pour cela d'une façon analogue à celle de M. ECHEVIN (1932, qui étudiait le phosphore soluble et le phosphore insoluble dans l'acide trichloracétique.

Extraction trichloracétique. — Nous avons pris 0 gr. 50 de germe délipidé que nous avons mis en contact avec 20 cm³ de solution d'acide trichloracétique à 10 % pendant une heure en ayant bien soin d'agiter fréquemment. Au bout de ce temps, nous avons séparé la liqueur par centrifugation. Nous avons fait une seconde extraction d'une demi-heure avec 10 cm³ de la même solution, puis une troisième de façon identique, puis nous avons opéré un dernier lavage avec 10 cm³. Les liqueurs ont été réunies et complétées à 50 cm³. La solution contenait la phytine et le phosphore minéral.

Dosage de la phytine. — Nous avons dosé la phytine par précipitation par le perchlorure de fer en présence de sulfo-cyanure d'ammonium à froid au pH optimum 5 donné par le rouge de méthyle, en ayant soin de laver le culot de centrifugation avec 5 cm³ de HCl N/10.

Dosage du phosphore minéral. — Le phosphore minéral a été précipité à l'état de phosphate ammoniaco-magnésien à l'ébullition et dosé selon la méthode de COPAUX.

Nous rassemblons dans le tableau suivant les résultats obtenus par cette méthode :

II bis. — Composés phosphorés du germe de blé.

	°/° Humide en gr.	°/° Sec en gr.	°/° du P. total
Phosphore total.	1,160	1,281	
Phosphore lipidique.	0,082	0,091	7
Phosphore nucléique	0,343	0,379	30
Phosphore phytinique. ?	0,549	0,606	47
Phosphore minéral	0,439	0,453	12
Phosphore organique(non dosé directement).	0,047	0,051	4

De l'examen de ce tableau et de celui de la page 73 il résulte que deux germes de provenance différente ont une composition très approchée.

Nous voyons que le phosphore total ne varie, en effet, que de 5 % environ.

Le phosphore lipidique dans chaque cas constitue la forme la moins abondante de phosphore. La proportion est de 7 à 9 % du phosphore total.

Le phosphore nucléique dans chacun des germes équivaut à 30 % du phosphore total.

L'extraction par l'acide trichloracétique à 1/10 nous donne toutefois un chiffre de phosphore phytinique légèrement différent. L'extraction de ce composé est plus complète que dans le traitement par le chlorure de sodium.

Cette méthode nous a permis de donner au phosphore minéral sa valeur à peu près réelle. C'est le point sur lequel nous voulons insister.

Dans notre précédente étude, nous établissions en bloc le phosphore minéral, plus une quantité indéterminée de phosphore organique sous une forme non précisée, par simple différence. Nous déterminions indirectement le phosphore minéral.

Cette extraction de la poudre délipidée par l'acide trichloracétique enlève tous les composés de cette poudre sauf les composés nucléo-protéidiques. Elle nous révèle un chiffre de phosphore phytinique supérieur de 5 % à celui que révèle l'extraction chlorurée. Il semble que nous trouvons là la quantité de phosphore qui refusait de se dissoudre dans la liqueur chlorurée-sodique. Cette fraction serait donc constituée par de la phytine. Qu'est-ce qui l'empêchait de se dissoudre? Serait-elle liée à d'autres principes immédiats et, de ce fait, ne pourrait se dissoudre? Nous ne pouvons répondre à cette question.

Variations du phosphore lipidique au cours de la conservation du germe. — Nous avons conservé un germe de blé pendant plusieurs mois dans un flacon à large goulot bouché au liège dans une pièce peu ventilée et humide. Au bout de deux mois le phosphore lipidique qui était au début de 91 milligr. pour 100 gr. de substance sèche, n'était plus que de 75 milligr. Nous l'y avons encore laissé quatre autres mois; au bout de ce temps, nous n'avons plus retrouvé que 27 milligr. Les autres composés phosphorés, les acides nucléiques, la phytine n'ont pas été dosés au cours de ces expériences.

Au cours de la conservation du germe, en présence d'humidité, les diastases peuvent donc commencer une hydrolyse des phospho-amino-lipides.

II. — EXTRACTION ET DOSAGE

DES PRINCIPES IMMÉDIATS PHOSPHORÉS DE LA GRAINE DE TOURNESOL.

La lentille que nous avons précédemment étudiée possède comme réserves des glucides et des protides. La quantité de lipides est au contraire très minime; aussi allons-nous étudier maintenant une graine dont la réserve est essentiellement de nature lipidique : celle de l'*Helianthus annuus* L.

On sait, en effet, que la graine d'*Helianthus* contient de 50 à 60 % d'une huile siccative.

La nature de la graine nous amène à modifier légèrement la méthode d'extraction que nous avons utilisée pour le germe de blé et la lentille. Ces modifications portent sur la détermination de l'humidité, l'extraction des lipides et de la phytine. En ce qui concerne le phosphore nucléo-protéidique nous conservons la méthode d'extraction chlorurée qui demeure ici encore la méthode de choix.

Détermination de l'humidité. — Nous avons préféré doser l'humidité dans la graine de tournesol en l'entraînant par distillation en présence d'une certaine quantité d'un carbure : le toluène. Le procédé de dessiccation à l'étuve, risquait, en effet, dans le cas particulier, de donner des résultats erronés par suite de l'oxydation des lipides. Nous avons donc utilisé la technique mise au point par MARCUSSON pour l'analyse des pétroles, utilisée depuis plusieurs années pour la détermination de l'eau dans les farines et appliquée récemment (1934, par M. LEYMARIE au dosage de l'eau dans les produits pharmaceutiques et alimentaires.

Nous dirons simplement que les vapeurs de toluène qui distillent entraînent l'eau des graines finement hachées. Cette eau se sépare du toluène par la suite, et on peut en mesurer le volume dans un tube gradué de forme convenable.

Extraction des lipides. — La grande quantité de lipides contenue dans cette graine rend difficile, sinon impossible toute pulvérisation par les moyens mécaniques habituels; aussi à l'aide d'une fine lame de rasoir, nous découpons ces graines en fragments excessivement petits que nous introduisons dans la cartouche du Kumagawa. Nous faisons une première extraction de six heures par l'alcool à 96°. Après cela la plus grande partie des lipides étant enlevée, nous passons la matière restante au mortier où elle se pulvérise assez facilement. Nous terminons l'extraction lipidique par l'alcool comme précédemment pendant quatre heures. Au bout de ce temps, quelques gouttes d'alcool de dernière extraction qu'on laisse tomber sur du papier buvard, ne produisent plus après évaporation de tache apparente. Nous en déduisons que l'extraction est complète.

La solution alcoolique suit à partir de ce moment le même sort que la solution lipidique du germe de blé ou de la poudre de lentilles.

Extraction par le chlorure de sodium à 12,5 %, en vue du dosage du phosphore nucléo-protéidique. — La poudre délipidée est desséchée à l'étuve à 50° jusqu'à poids constant, puis pesée et réduite encore à une plus grande finesse. Une prise de 2 gr. de poudre fine est extraite pendant une demi-heure à l'ébullition par 100 cm³ de solution de chlorure de sodium, plus triacétide, comme il a été exposé.

Au bout de ce temps, l'on se rappelle qu'il est passé en solution dans le cas du germe de blé et de la poudre de lentilles 90 à 95 % du phosphore total. Notre graine de tournesol délipidée qui se laisse mouiller difficilement, ne cède à la solution chlorurée que 49 milligr. de phosphore sur 119 milligr. qu'elle contient, soit 40 % des composés phosphorés. Il reste donc 60 % du phosphore non solubilisé.

Devant un tel écart, il devenait nécessaire de reprendre le résidu pour une nouvelle extraction chlorurée sodique.

Le culot pèse 16 grammes, il contient donc 2 grammes de poudre + 14 grammes de solution chlorurée sodique de la première extraction. Nous ajoutons de la solution chlorurée suffisamment pour parfaire le volume à 100 cm³, soit 88 cm³, qui extraient de nouveau 11 milligr. 8, moins les 2 milligr. 30, des 14 cm³ qui restaient dans le culot de centrifugation, soit 9 milligr. 5 sur les 119 milligr., autrement dit 8 %.

En deux extractions successives, on peut donc dissoudre 48 % des composés phosphorés de la poudre délipidée. Dans de telles conditions, il devient nécessaire de savoir quel est le sort du phosphore nucléo-protéidique. A cet effet, nous précipitons 30 cm³ de la liqueur de première extraction qui est à $pH = 5,8$, par 2 cm³ d'acide chlorhydrique N/10. Par agitation vigoureuse, il se fait un précipité abondant qu'on laisse déposer pendant douze heures. Au bout de ce temps, on ajoute 1 cm³ de solution N/10 qui donne un nouveau précipité et ainsi de suite. Il faut 5 cm³ de solution N/10 d'HCl pour obtenir la précipitation intégrale. A ce moment, le pH de la solution est égal à 2 environ (détermination colorimétrique). Les différents précipités rassemblés sont lavés avec 5 cm³

d'alcool à 60° et détruits. Ils contiennent 0 milligr. 55 de phosphore nucléique. Les 100 cm³ renferment donc 1 milligr. 83 de phosphore nucléique.

Dans la deuxième extraction, nous opérons de même la précipitation du phosphore nucléique sur l'ensemble des 100 cm³ contenant 14 cm³ de la première extraction. La solution après extraction chlorurée sodique est à pH 5,7 et au moment où la précipitation est complète nous notons un pH voisin de 2. A ce moment, le précipité nucléique contient environ 0 milligr. 25 de phosphore. C'est ce qui restait dans les 14 cm³ de liqueur du culot de centrifugation de notre première extraction.

Nous déduisons de là que la deuxième extraction des composés phosphorés par le chlorure de sodium n'enlève plus de composés nucléiques. Le déficit qui se produit porte donc uniquement sur le phosphore phytinique et sur le phosphore minéral.

Extraction par l'acide trichloracétique à 10 % en vue du dosage du phosphore phytinique. — La méthode d'extraction au chlorure de sodium ne nous ayant pas donné de résultats satisfaisants dans le cas de la poudre délipidée de graine de tournesol, du moins pour les principes immédiats phosphorés autres que les composés nucléo-protéidiques, nous avons eu recours à la méthode à l'acide trichloracétique déjà utilisée pour l'extraction des composés phosphorés du germe de blé.

Une quantité de 0 gr. 50 de poudre délipidée est mise en contact dans un tube à centrifuger avec 20 cm³ de solution d'acide trichloracétique à 10 % et agitée fréquemment. Au bout d'une heure, on sépare par centrifugation le liquide que l'on met dans une fiole jaugée de 50 cm³. On fait deux nouvelles extractions d'une demi-heure avec 10 cm³ de liqueur trichloracétique chaque fois, puis un dernier lavage avec 10 cm³. On complète à 50 cm³, et on prend deux portions de 10 cm³ en vue du dosage du phosphore phytinique.

Pour cela, on neutralise la liqueur par l'ammoniaque en présence de rouge de méthyle, puis on se remet en milieu acide par addition d'une petite quantité d'acide chlorhydrique N. A ce moment, on précipite à froid la phytine par le chlorure ferrique en présence de sulfocyanate d'ammonium. Le précipité centrifugé est lavé par 5 cm³ de solution N/10 d'acide

chlorhydrique, puis minéralisé, et le phosphore est dosé selon la méthode de COPAUX.

En même temps, deux portions de 10 cm³ ont été évaporées et minéralisées en vue du dosage du phosphore total soluble. Nous nous sommes rendu compte qu'à part les composés nucléiques tout passait en solution.

Le phosphore minéral, s'il existe, est donc passé en solution. Pour le doser, nous avons pris 40 cm³ de cette solution trichloracétique que nous avons additionnée de liqueur magnésienne et portée à l'ébullition tout en ajoutant quantité suffisante d'ammoniaque, comme dans le cas du germe délipidé traité par la solution trichloracétique. Nous avons abandonné le tout pendant douze heures. Au bout de ce temps, le précipité recueilli a été après lavage dissous dans l'acide sulfurique dilué et introduit dans l'ampoule de COPAUX.

Cette fois, au lieu de nous trouver en présence d'une petite quantité de complexe éthéro-molybdique, comme dans le cas du germe de blé, nous n'avons pas observé de complexe. Nous n'avons pas pu déceler de phosphore minéral dans notre graine par cette méthode.

Nous avons résumé dans le tableau suivant les quantités des différents composés phosphorés contenus dans les graines de tournesol.

III. — Composés phosphorés de la graine d'*Helianthus annuus*.

	% Humide en gr.	% Sec en gr.	% du P. total
Phosphore total	0,666	0,746	
Phosphore lipidique.	0,014	0,015	2,46
Phosphore nucléique	0,030	0,032	4,50
Phosphore phytinique.	0,512	0,550	76,80
Phosphore restant (organique indéterminé).	0,410	0,418	46,54

Nous voyons, d'après ces résultats, que les composés phosphorés ne se répartissent pas comme dans la graine de lentilles.

Le *phosphore total* est en plus grande abondance dans l'*Helianthus*. Parmi les composés phosphorés, celui qui vient

au premier rang par son abondance est le *phosphore phytinique* qui représente ici 77 % du phosphore total.

Le *phosphore lipidique* et le *phosphore nucléique* sont en quantités très faibles. On aurait pu s'attendre à un chiffre élevé de phosphore lipidique, étant donnée la forte proportion de lipides de la graine.

Nous nous trouvons en présence de 16 % de composés phosphorés solubles dans l'acide trichloracétique qui ne précipitent pas par le chlorure ferrique. Serions-nous ici en présence d'esters inférieurs de l'inosite, mono- et diesters? De l'avis de M. POSTERNAK, qui a étudié l'action du chlorure ferrique sur les esters phosphoriques de l'inosite, ces esters inférieurs ne seraient pas précipités. Puisque la liqueur magnésienne n'a pas précipité de composés inorganiques du phosphore, nous sommes en droit d'émettre cette hypothèse sur la nature de ce phosphore restant.

ÉTUDE COMPARATIVE DES COMPOSÉS PHOSPHORÉS DU GERME DE BLÉ, DE LA GRAINE DE LENTILLE, DE LA GRAINE DE TOURNESOL. — Nos trois matières premières nous ayant donné des valeurs différentes pour leurs composés phosphorés, nous croyons utile de rassembler ces valeurs en un tableau dans lequel nous indiquerons les valeurs absolues des composés et leurs valeurs relatives pour 100 du phosphore total.

	Germe de blé sec en gramme	Graine de lentilles sèche en gramme	Graine d' <i>Helianthus</i> sèche en gramme	Germe de blé % du P. total	Graine de lentilles % du P. total	Graine d' <i>Helianthus</i> % du P. total
Phosphore total . . .	4,281	0,381	0,746			
Phosphore lipidique .	0,094	0,046	0,045	2	12,07	2,16
Phosphore nucléique..	0,379	0,043	0,032	30	11,02	4,50
Phosphore phytinique.	0,606	0,192	0,550	47	50,40	76,80
Phosphore minéral . .	0,153	»	»	12	»	»
Phosphore restant . . .	0,051	0,100	0,118	4	26,20	16,54

Nous voyons que, de nos trois exemples (1), le germe de blé

1. J'ai pris pour cette étude technique le germe de blé et non pas le grain total qui, en raison de sa surcharge en matières amylacées, aurait présenté de grandes difficultés techniques.

est, comme il est très naturel, le plus riche en *phosphore total*, puis vient la graine d'*Helianthus* qui est encore deux fois plus riche que la graine de lentille.

Pour le *phosphore lipidique*, le germe contient encore la plus forte proportion. Mais ici, la graine d'*Helianthus* contient trois fois moins que la lentille, malgré une richesse incomparablement plus grande en lipides totaux.

Le germe est très riche en *phosphore nucléique* qui représente le $\frac{1}{3}$ environ de son phosphore total. Les graines entières, lentille et *Helianthus*, sont naturellement beaucoup moins riches. La lentille ne possède que le $\frac{1}{10}$ de son phosphore total en nucléoprotéides et la graine d'*Helianthus* en est très pauvre, puisqu'elle voit son phosphore nucléique représenté seulement par 5 % du phosphore total.

Dans nos trois exemples, la plus grande partie du phosphore se trouve sous forme *phytinique*. C'est l'*Helianthus* qui renferme la plus forte proportion (77 % du phosphore total). Le germe et la lentille ont environ 50 % de leur phosphore sous forme de phytine.

Le *phosphore minéral* n'a pu être correctement dosé que dans le germe où il représente environ 10 % du phosphore total. Chez l'*Helianthus*, le phosphore restant est vraisemblablement en majorité constitué d'esters inférieurs de l'inosite. Dans la lentille, une partie aussi est sans doute constituée par ces esters.

LES COMPOSÉS INSOLUBLES DANS LA SOLUTION CHLORURÉE SODIQUE.

LIAISON DE LA PHYTINE AVEC D'AUTRES PRINCIPES IMMÉDIATS. —

Une mention spéciale est à faire ici au sujet de l'extraction chlorurée sodique de la poudre délipidée de nos trois matériaux d'étude.

Dans 2 cas étudiés, celui du germe de blé qui laisse 6 % à 10 % de composés phosphorés insolubles, et celui de la graine d'*Helianthus* qui en laisse 60 % environ, tout le phosphore nucléique est passé en solution. Une nouvelle extraction chlorurée sodique faite dans les mêmes conditions n'a pas dissous de nouveaux composés nucléoprotéidiques. Il paraît donc hors de doute que l'extraction des composés phosphorés nucléiques

par le chlorure de sodium à 12,5 % soit la méthode de choix pour l'extraction de ces composés ⁽¹⁾.

La portion de composés phosphorés insolubles, faible dans le cas du germe et de la lentille, devient très importante dans le cas de l'*Helianthus*.

Dans le cas du germe, l'extraction trichloracétique enlève une plus forte quantité de phytine : 47 % du phosphore total au lieu de 42 %. Même en admettant que l'ébullition de notre liqueur chlorurée pendant une demi-heure ait hydrolysé 2 à 5 % de la quantité théorique (JAROSZ Wt., 1933), il est hors de doute que l'acide trichloracétique réalise une meilleure extraction. Il semble que la fraction insoluble dans la solution chlorurée soit en partie tout au moins de nature phytinique.

Dans le cas de l'*Helianthus*, les résultats sont encore plus nets. Nous trouvons 77 % du phosphore total sous forme phytinique par extraction au moyen de l'acide trichloracétique, alors que le phosphore soluble total dans la solution chlorurée atteint seulement 40 %. Dans ce dernier cas, il y a donc au moins 37 % de phytine soluble dans l'acide trichloracétique qui refuse de se dissoudre dans le chlorure de sodium.

D'où provient cette différence dans la solubilisation des composés phosphorés du germe et de l'*Helianthus*? Il nous faut admettre qu'il doit exister dans les graines des liaisons entre la phytine et d'autres composés, les protéines par exemple, à moins que ces liaisons ne se forment au cours des extractions comme les expériences de M^{lle} MNICH (1931) semblent le démontrer.

A. GOLDOWSKI et A. BOZHENKO (1932), dans une publication que nous n'avons pu nous procurer et dont nous avons seulement relevé un extrait dans *Chemical Abstracts*, pensent que pour doser la phytine dans les végétaux contenant des tannins, il faut d'abord commencer par oxyder la matière au moyen du permanganate de potassium. Ayant opéré ainsi à propos de la graine d'*Helianthus*, ils ont pu en extraire 84,6 % de phosphore sous forme de phytine.

Que ces liaisons existent dans la graine ou qu'elles se

1. Ceci n'entend pas dire qu'éventuellement il ne pourra pas être utile de renouveler une extraction chlorurée.

forment au cours des extractions, qu'elles mettent en combinaison tel ou tel principe immédiat avec la phytine, nous ne nous y arrêterons pas pour l'instant; les résultats différents obtenus au moyen du chlorure de sodium et de l'acide trichloracétique ne peuvent s'expliquer par des différences de solubilité de la phytine dans ces solutions. Nous ne pouvons les expliquer que par la quantité plus ou moins grande de phytine liée, et nous pensons qu'une fois ces liaisons dissociées, nous pourrions faire passer en solution la totalité des composés phytiniques.

Ces combinaisons insolubles dans le chlorure de sodium ne sauraient d'ailleurs influencer le dosage du phosphore nucléique, comme le pensait M. POSTERNAK. Étant donné leur insolubilité dans le chlorure de sodium, elles ne risquent pas d'être comptées comme phosphore nucléique.

CHAPITRE IV

ÉVOLUTION DES COMPOSÉS PHOSPHORÉS AU COURS DE LA GERMINATION ⁽¹⁾ DE LA LENTILLE

PRÉAMBULE

La mise au point de nos techniques nous a déjà permis de fixer d'une manière plus précise la répartition des différents principes immédiats phosphorés du germe de blé, des graines de lentille et de tournesol.

Jusqu'à présent l'étude de l'extraction des principes immédiats phosphorés des graines n'avait été abordée que par les extractions acides autant dans la graine mûre qu'au cours des premiers stades de sa germination. Ces méthodes ont permis de montrer, comme nous l'avons vu plus haut, que le phosphore phytinique constitue une forme de phosphore qui est utilisée par la jeune plantule au cours des premiers stades de la germination, cette utilisation donnant lieu à une transformation en composés minéraux.

Malheureusement, comme nous l'avons dit plus haut, la détermination des composés nucléiques par dosage du phosphore insoluble dans les solutions acides ne nous paraissait pas donner les garanties suffisantes et nous ne pouvions accepter sans réserves les résultats ainsi obtenus.

Aussi dans les études physiologiques que nous avons faites, avons-nous utilisé la méthode d'extraction chlorurée précédemment exposée. Elle nous a permis de séparer les composés nucléiques des autres principes immédiats phosphorés, et

1. Nous avons d'abord appliqué nos méthodes à l'étude de la germination car jusqu'à présent c'est à ce seul problème que se sont attaqués les physiologistes. Nous avons voulu voir si nous obtiendrions les mêmes résultats. Ce n'est que par la suite que nous avons abordé le problème qui aurait dû logiquement nous intéresser d'abord, celui de la formation de la graine.

de suivre ainsi leur évolution au cours de la germination d'une des graines déjà étudiée plus haut : la lentille.

Connaissant l'évolution des composés phosphorés au cours de la germination de la lentille, nous avons fait quelques essais pour savoir quelles étaient les étapes de leur formation dans la graine qui mûrit.

Nous aurions pu nous adresser ici encore à la lentille, mais pour des facilités d'exécution, nous avons préféré prendre une graine plus grosse et plus riche en phosphore. Nous avons choisi la graine de tournesol, que nous avons étudiée aussi à l'état de vie ralentie dans un chapitre précédent.

Les essais exécutés sur la graine de tournesol ont été plus restreints que sur la graine de lentille pour la raison suivante : la période de maturation de ces graines dure un temps relativement court; on ne peut faire mûrir ces graines à volonté comme on fait germer des lentilles. Plusieurs prélèvements avaient été faits en vue de recherches plus étendues. Mais les techniques envisagées pour la lentille durent être adaptées à cette nouvelle graine, ce qui nous fit dépenser une bonne partie de notre matériel d'études. Nous ne voulons pas toutefois passer sous silence les quelques résultats obtenus, car ils contribueront à jeter un jour nouveau sur le métabolisme des composés phosphorés.

Nous avons tout d'abord voulu nous rendre compte de ce qui se passe au cours de la germination de la lentille.

Les composés nucléiques qui existent dans la proportion de 10 % environ dans la graine non germée doivent-ils servir aux échanges nutritifs des premiers jours de vie de la plantule comme il se passe pour la phytine, et disparaître ensuite si de nouveaux apports de substance nutritive n'arrivent de l'extérieur?

Peuvent-ils au contraire se régénérer au fur et à mesure de la croissance de la plante et peut-être même augmenter au cours de processus aussi intenses que ceux qui accompagnent les premiers stades de la germination?

Si ces corps se forment au cours de la germination, aux dépens de quelles substances prennent-ils naissance?

Autant de questions auxquelles nous allons essayer de répondre.

Chemin faisant, comme nous avons donné une méthode de

précipitation de la phytine, nous allons l'appliquer à nos essais de germination, de même que nous envisagerons le devenir des phospho-lipides et du phosphoré minéral.

Nous avons choisi pour l'étude de la germination la graine de lentille, que nous avons déjà étudiée à l'état de vie ralentie.

L'étude comparative de la graine de lentille et de la graine de tournesol nous a montré en effet que ces deux graines, différentes de par la nature de leurs réserves, qui sont surtout glucidiques chez la première et lipidiques chez la seconde, ne se comportaient pas de même façon vis-à-vis de nos réactifs. La solution chlorurée-sodique qui enlève la presque totalité des composés phosphorés de la lentille est loin de donner ces résultats pour le tournesol. Les liaisons qui retiennent les composés phosphorés sont-ils de nature différente? Nous ne le savons pas. Quoi qu'il en soit, il nous a paru de la plus élémentaire prudence d'opérer nos essais de germination sur une graine que nous connaissions bien, dont nous savions extraire les composés phosphorés qu'il s'agissait de voir évoluer.

La graine de lentille possède d'ailleurs les qualités nécessaires à l'obtention de bonnes germinations. Toutes les graines d'un même lot ont une conformation à peu près identique; elles possèdent un grand pouvoir germinatif, un poids sensiblement égal, surtout si l'on a soin d'opérer sur des lots de plus de 100 graines. Voici en effet les poids de quatre lots de 100 graines: 7 gr. 350, 7 gr. 310, 7 gr. 420, 7 gr. 470.

La plus grande difficulté, qui n'est pas spéciale à la lentille, mais que l'on retrouve dans tous les essais de germination, consiste à obtenir des plantules sensiblement semblables.

Lorsqu'on fait germer un certain nombre de graines, il arrive fréquemment que certaines germinations se développent alors que d'autres restent chétives, ne germent pas ou pourrissent. Avec un peu d'habitude, on arrive à prendre un certain nombre de précautions qui permettent d'obtenir des germinations très homogènes. On voit par exemple bientôt certaines graines dont les téguments commencent à brunir plus que leurs voisines; on a soin de les enlever au moyen d'une petite pince, sans quoi on s'exposerait à les voir envahies par les moisissures, ce qui fausserait évidemment les résultats et rendrait la germination impropre à des essais quantitatifs.

Première germination. — Dans une première germination, à une époque où nous n'avions pas encore pu mettre au point de méthodes de dosage du phosphore nucléique et du phosphore phytinique, nous avons dû nous contenter de doser le seul constituant que nous pouvions apprécier d'une façon convenable : le phosphore lipidique.

Nous avons pratiqué cette germination en février 1931, dans une pièce du laboratoire qui recevait la lumière, peu intense à cette époque de l'année, par une grande fenêtre. La température atteignait 18-20° pendant la journée, mais tombait à 13-14° durant la nuit.

Les graines ont été lavées plusieurs fois à l'eau du robinet jusqu'à élimination de toute trace de poussière. Nous les avons ensuite mises à tremper pendant vingt-quatre heures dans de l'eau qui avait été distillée dans un appareil en verre.

Nous nous sommes rendu compte, en effet, que l'eau distillée du laboratoire contenait des traces de cuivre provenant de l'appareil distillatoire, traces qui suffisaient à retarder la germination.

En faisant germer quatre lots de 10 grains de blé : le premier dans de l'eau du robinet, le deuxième dans l'eau distillée du laboratoire, le troisième dans de l'eau du robinet distillée dans un appareil de verre, le quatrième dans l'eau du robinet deux fois distillée dans un appareil de verre, nous avons vu qu'au bout du même laps de temps, le premier lot s'était développé plus que les autres ; les racines principales très longues portaient des racines secondaires. Le troisième et le quatrième lot s'étaient développés un peu moins que le précédent : les tigelles étaient moins hautes, portaient moins de feuilles, les racines ne portaient pas de radicelles. Le lot qui avait le moins profité était celui qui s'était développé dans l'eau distillée du laboratoire, les tiges étaient beaucoup moins hautes, les racines s'étaient à peine développées.

Nous avons conclu à la toxicité de cette eau et nous l'avons rejetée. Nous aurions voulu la remplacer par de l'eau de pluie qui nous semblait ajouter à l'absence de toxicité une qualité supplémentaire, celle d'être aérée. Les circonstances ne nous ayant pas permis d'en avoir sous la main, nous avons préparé de l'eau bidistillée dans un appareil de verre.

Devant la nocivité de si petites quantités de cuivre, nous avons évité intentionnellement de stériliser nos graines par le sublimé, comme on le fait habituellement avant de les mettre à germer. Nous pensions que le mercure pouvait avoir une semblable toxicité. Nous nous sommes contenté d'écarter soigneusement les graines qui, après trempage, avaient bruni; nous avons remarqué en effet que ce sont celles qui ne germent pas et qui pourrissent.

Après trempage de vingt-quatre heures, nos graines ont été déposées dans des cuves photographiques sur du sable lavé aux acides, à l'eau, puis séché et calciné. Les graines ont été placées de façon à rester constamment en contact avec le sable que nous imbibions suffisamment d'eau pour qu'elles pussent progresser normalement.

Au bout de quelques heures, la radicule commence à se développer, puis c'est la tigelle qui écarte les deux cotylédons qui la tiennent emprisonnée. Comme nous voulions suivre les variations du phosphore lipidique à la lumière et à l'obscurité, nous avons soustrait une partie de nos cuves photographiques à l'action de la lumière en les plaçant dans une armoire où ne pouvaient pénétrer les rayons lumineux, mais où la température demeurerait sensiblement égale à celle de l'expérience menée à la lumière.

Dans l'un et l'autre cas, nous avons suivi les plantules pendant trente-trois jours. Nous avons fait un premier prélèvement de 500 graines au bout du quatrième jour; à ce moment, seule la radicule était encore apparue.

Un deuxième prélèvement fut fait le sixième jour, la tigelle avait déjà fait son apparition et les petites feuilles aussi. Dans l'échantillon prélevé à la lumière, la chlorophylle commençait à verdir les jeunes pousses.

Un troisième prélèvement fut fait au bout de treize jours. A ce moment, les premières feuilles étaient déjà bien développées, les tigelles atteignaient une longueur de 20 à 25 mm.

Un dernier prélèvement fut opéré au bout de trente-trois jours, les tigelles atteignaient à ce moment de 50 à 60 mm. de longueur.

Chaque prélèvement, comme nous l'avons dit plus haut, comprenait 500 graines germées. On avait bien soin de prendre

des jeunes plantules de même longueur afin d'avoir des échantillons aussi homogènes que possible.

Aussitôt le prélèvement effectué, les racines étaient passées sous un courant d'eau afin de faire tomber les grains de sable adhérents : les plantules étaient séchées sur du papier buvard et aussitôt après avoir été pesées, elles étaient stabilisées pendant vingt minutes dans vingt fois leur poids d'alcool bouillant, le ballon étant muni d'un réfrigérant à reflux. Le tout était ensuite abandonné au refroidissement et laissé en contact avec l'alcool jusqu'au lendemain.

Après vingt-quatre heures, la solution alcoolique était décantée dans un ballon jaugé, les graines avec leurs tiges et leurs racines étaient jetées sur un filtre et lavées à l'alcool pour parfaire la solution alcoolique à un volume déterminé qui était noté.

Le filtre était d'abord séché à l'air libre puis à l'étuve à 50° jusqu'à poids constant. On prenait le poids de la plante séchée et on la pulvérisait au moulin à noix d'acier communément désigné sous le nom de « moulin ture » ; ensuite on la passait au tamis n° 80.

Après cette manipulation, pulvérisation au mortier et tamisage, malgré toutes les précautions prises il s'était perdu une certaine quantité de substance, d'ailleurs très petite, qu'il était nécessaire de déterminer exactement afin d'en tenir compte par la suite. Il ne suffisait pas de peser la poudre tamisée et de voir la perte subie, car, au cours de la manipulation, il y avait augmentation de l'humidité. Une nouvelle dessiccation devenait donc nécessaire, après toute pulvérisation, avant d'obtenir le poids réel de la substance restante.

Cette poudre fine était introduite dans l'appareil de Kumagawa et épuisée comme il a été dit plus haut pendant douze heures.

Une partie des liquides d'extraction était réunie à une partie correspondante du liquide de stabilisation et traitée en vue de l'extraction des lipides.

Nous avons insisté déjà sur la nécessité de dessécher par l'alcool absolu le résidu d'extraction du germe de blé et de la poudre de lentilles si l'on ne veut pas, par la suite, voir passer dans l'éther anhydre des composés phosphorés autres que des

phosphatides. Il va sans dire que, dans le cas présent, pareille nécessité s'impose d'une façon encore plus évidente. Nos jeunes plantules se sont en effet gorgées d'eau au cours de la germination et au moment de la stabilisation le suc cellulaire s'est mélangé à l'alcool : c'est dire qu'une partie des composés phosphorés est passée en solution dans l'alcool descendu à un titre voisin de 60°.

Il ne viendrait à l'idée de personne de compter pour phosphore lipidique tout le phosphore contenu dans ces solutions. Voici à titre d'exemple ce qui peut passer de la sorte comme phosphore non lipidique en solution dans l'alcool de stabilisation :

	PHOSPHORE lipidique de 500 lentilles en milligrammes	PHOSPHORE non lipidique du liquide de stabilisation en milligrammes
Premier stade	13,5	1,70
Deuxième stade	12,33	5,55
Troisième stade	10,55	8,25
Quatrième stade	7,90	14,80

On voit ainsi que plus la germination est avancée, plus est élevée la quantité de phosphore non lipidique qui passe dans le liquide de stabilisation, la plante devenant parallèlement beau-

Germination de cinq lots de 500 lentilles à la lumière sur sable calciné. Variations des lipides totaux et du phosphore lipidique.

DURÉE DE LA GERMINATION	POIDS de la substance fraîche en gr.	LIPIDES TOTAUX en gr.	PHOSPHORE lipidique en milligr.
Avant germination.	41,48	1,260	15,5
Premier stade (4 jours) . . .	60,7	1,150	13,9
Deuxième stade (6 jours). . .	73,7	1,110	13,3
Troisième stade (13 jours) . .	93	1,050	13,9
Quatrième stade (33 jours). .	109	»	9,8

coup plus riche en eau. D'où la nécessité de veiller à une bonne dessiccation à l'aide d'alcool à 95°, puis d'alcool absolu, sous pression réduite afin de ne pas porter préjudice aux lipides et de ne pas les insolubiliser.

Dans le tableau ci-dessus, nous donnons les résultats que

nous avons obtenus au cours des quatre stades évolutifs déjà signalés en présence de lumière.

A l'examen, il résulte qu'à la lumière il y a une baisse progressive des lipides et du phosphore lipidique. Pendant les trois premiers stades, il semble que cette baisse soit assez peu prononcée et se fasse avec une grande lenteur. Nous voyons qu'au bout de treize jours, en effet, il n'y a qu'une perte de 10 %, perte qui va s'intensifier par la suite pour atteindre 37 % environ de la valeur initiale.

Voyons maintenant comment se passent les phénomènes à l'obscurité :

Germination de cinq lots de 500 lentilles à l'obscurité sur sable calciné. Variations des lipides totaux et du phosphore lipidique.

DURÉE DE LA GERMINATION	POIDS de la substance fraîche en gr.	LIPIDES TOTAUX en gr.	PHOSPHORE lipidique en milligr.
Avant germination.	41,48	1,260	15,5
Premier stade (4 jours) . . .	60,2	1,145	13,5
Deuxième stade (6 jours) . . .	83	1,065	12,35
Troisième stade (13 jours) . . .	97	1,030	10,55
Quatrième stade (33 jours) . .	134	0,885	7,90

Dans notre germination à l'obscurité, l'ordre des phénomènes est analogue. Comme à la lumière, les lipides totaux et le phosphore lipidique diminuent. Ils diminuent toutefois plus rapidement. A la lumière, au bout de treize jours, nous assistons à une chute du phosphore lipidique, de 10 %, tandis qu'à l'obscurité elle est de 33 %. A la fin de la période expérimentale, nous assistons ici à une chute de 50 % au lieu de 37 % à la lumière.

Les auteurs qui avant nous avaient étudié l'utilisation des matières grasses au cours de la germination, étaient unanimes à trouver que, dans les premiers jours, il se faisait une modification peu sensible, tandis que, dans une deuxième période, on voyait des abaissements beaucoup plus considérables de l'ordre de 60 % (LETELLIER) à 80 % (MAQUENNE).

En appliquant la même méthode que nous au cours de la germination du lupin, MM. HEE et BAYLE (1932) ont assisté égale-

ment à une chute des corps gras totaux et à une chute du phosphore lipidique.

Ils ont assisté aussi à une chute beaucoup moins prononcée à la lumière qu'à l'obscurité, en relation naturellement avec une synthèse des phospholipides à la lumière.

En résumé, dans une première période s'étendant sur treize jours dans nos expériences, le phosphore lipidique a assez peu diminué à la lumière, tandis qu'à l'obscurité il a déjà diminué du tiers.

Pendant la deuxième période, c'est-à-dire du treizième au trente-troisième jour, la perte a été plus forte. Elle a atteint 37 % à la lumière et 50 % à l'obscurité. Durant chaque période la perte a été moins forte à la lumière. On ne peut pas admettre des processus de désintégration moins intenses dans ce cas; il nous faut donc envisager qu'il y a en même temps qu'utilisation, synthèse des phospho-lipides à la lumière.

Deuxième germination. — Les techniques ayant été mises au point en ce qui concerne, outre le phosphore lipidique, le phosphore nucléique et le phosphore phytinique, nous avons effectué une deuxième germination dans les mêmes conditions que la première.

Nous avons encore semé nos lentilles sur du sable lavé et calciné.

Les salles du laboratoire ne constituant pas le milieu idéal pour ces sortes d'expérimentations, nous avons réalisé notre expérience dans les serres du Muséum d'Histoire Naturelle, mises obligeamment à notre disposition par M. Bois, professeur de culture.

La moitié de nos cuvettes photographiques était directement exposée aux rayons solaires, l'autre moitié placée au voisinage de la première était soustraite à l'action de la lumière au moyen d'un papier noir. Nous avons fait en sorte d'entretenir dans les deux séries d'essais une humidité convenable. Pour cela nous avons placé nos cuvettes à l'intérieur d'un châssis en bois de 10 cm. de hauteur environ, que nous avons recouvert d'une vitre.

Les températures elles-mêmes étaient très voisines. Elles atteignaient parfois 30° au moment de la plus forte insolation dans la journée. Nous étions ici au mois de mai.

Nous avons fait nos prélèvements comme dans notre première expérience en prenant les mêmes précautions.

Le premier prélèvement fut fait au bout de quarante-huit heures, alors que la racicule commençait à peine à sortir.

Le second fut fait au bout de trois jours, à l'apparition de la chlorophylle dans la germination exposée à la lumière. Dans l'essai mené à l'abri de la lumière nous avons choisi des plantes arrivées au même stade de développement que les premières.

Le troisième prélèvement fut fait au bout de cinq jours, les tigelles atteignaient 20 à 25 mm. de hauteur.

Le quatrième au bout de huit jours, la hauteur des tigelles était de 50 à 60 mm. environ.

On remarque la rapidité avec laquelle fut menée cette germination. La chaleur de la saison permettait aux graines de pousser aussi rapidement : en huit jours les caractères extérieurs de la plante permettaient de dire que le chemin parcouru était aussi grand que celui fait en trente-trois jours lors de la première expérience.

Voyons si les résultats numériques concordaient avec cet aspect d'évolution rapide. Nous avons utilisé les techniques telles que nous les avons énoncées plus haut :

1° Extraction du phosphore lipidique par l'alcool à 95° après stabilisation ;

2° Extraction des autres composés phosphorés par la solution chlorurée sodique, dans laquelle nous dosions l'acide nucléique par précipitation par l'acide chlorhydrique, la phytine par précipitation par le chlorure ferrique. Le phosphore minéral étant obtenu par différence.

Voyons tout d'abord quels sont les phénomènes qui se sont passés à la lumière. Nous avons réuni, dans les deux tableaux suivants, les données expérimentales qui résument l'expérience (voir page ci-contre).

CONSTATATIONS EXPÉRIMENTALES. — L'examen des résultats nous conduit aux constatations suivantes :

1° Au cours de la germination à la lumière, nos plantules absorbent une grande quantité d'eau ; aussi voyons-nous les *poids* humides augmenter dans de fortes proportions. La graine au repos ne renferme que 13 % d'eau alors que, après

I. — Variations du poids humide et du poids sec au cours de la germination de la lentille à la lumière. Expérience portant sur cinq lots de 400 lentilles.

DURÉE DE LA GERMINATION	POIDS humide en grammes	POIDS sec en grammes	PERTE de substance sèche %	EAU de la plante fraîche %
Avant germination. . . .	29,80	25,80	»	13
Premier stade (2 jours) .	60	25,70	0,4	57,1
Deuxième stade (3 jours) .	64	25,44	1,5	60,2
Troisième stade (6 jours) .	75,3	23,80	8	68,3
Quatrième stade (9 jours) .	113	23,42	9,5	79,3

II. — Variations des composés phosphorés au cours de la germination de la lentille à la lumière. Expérience portant sur cinq lots de 400 lentilles.

DURÉE de la germination	PHOSPHORE LIPIDIQUE en milligrammes	PHOSPHORE NUCLÉIQUE en milligrammes	PHOSPHORE PHYTIQUE en milligrammes	PHOSPHORE MINÉRAL en milligrammes	PHOSPHORE LIPIDIQUE % du phosphore total	PHOSPHORE NUCLÉIQUE % du phosphore total	PHOSPHORE PHYTIQUE % du phosphore total	PHOSPHORE MINÉRAL % du phosphore total
Avant germ. .	12,67	10,4	50,63	18,30	13,7	11,3	55	20
1 ^{er} stade (2 j.).	11,85	9,76	48,38	21,81	12,8	10,6	52,6	23,5
2 ^e stade (3 j.).	11,35	11,15	38,31	30,84	12,3	12,1	41,6	33,5
3 ^e stade (6 j.).	10,25	12,50	12,64	54,61	11,1	13,5	13,7	59,3
4 ^e stade (9 j.).	9,45	15,25	0	62,30	10,2	16,5	0	67,7

trois jours, elle en contient déjà 60 % et au bout de neuf jours 80 %.

La perte en *substance sèche* par rapport au poids initial atteint 10 % environ au bout de neuf jours.

2° L'évolution des composés phosphorés nous montre en ce qui concerne tout d'abord le *phosphore lipidique* que la teneur de 12 milligr. 64 avant germination, soit 13,7 % du phosphore total, tombe à 9 milligr. 5, soit 10 % du phosphore total. Nous voyons donc que le phosphore lipidique suit la même marche que dans la première germination. Dans cette dernière expérience nous avons assisté en huit jours au même dévelop-

ment des organes végétatifs : feuilles, tiges, racines, que dans la précédente. La consommation des lipides n'a toutefois pas été comparable puisque nous n'avons eu que 25 % de phosphore lipidique consommé cette fois contre 37 % auparavant.

3° Quant au *phosphore nucléo-protéidique*, nous assistons dans les deux premiers jours de la germination à une baisse de 5 %, baisse assez faible pour que nous n'en tenions pas autrement compte, car il faut faire la part du coefficient d'erreur expérimentale. Mais par la suite nous assistons à une synthèse très importante de ces composés. Nous les voyons progressivement passer de 40 milligr. avant germination à 12,5 au sixième jour et à 15,25 au neuvième jour. Nous sommes là en présence d'une augmentation de 50 % du chiffre initial. La formation de ces composés au cours de la germination à la lumière est évidente.

4° Le *phosphore phytinique* qui comprend environ 55 % du phosphore total avant germination, tombe légèrement dès le deuxième jour. Au bout de trois jours, sa valeur est déjà tombée de 25 %. Cette chute ne fait d'ailleurs que se précipiter, puisque, après six jours, elle atteint 75 % environ. Dès le neuvième jour, *il ne subsiste plus trace de phytine dans la graine.*

5° Ce phosphore phytinique s'est d'ailleurs transformé en *phosphore minéral* pour la majeure partie, sinon pour la totalité. On peut peut-être admettre qu'il a servi pour une faible part à construire l'édifice nucléique. En tous cas, à la fin de la période expérimentale, le phosphore minéral est bien la forme qui est représentée par le chiffre le plus élevé parmi tous les composés phosphorés de la graine.

Voyons maintenant les phénomènes qui se sont passés à l'obscurité. Nous résumons de même nos expériences au moyen des deux tableaux suivants (voir page ci-contre).

CONSTATATIONS EXPÉRIMENTALES. — De l'examen de ces tableaux, il découle :

1° *La teneur en eau* augmente au cours de la germination à l'obscurité tout comme à la lumière. Elle augmente plus rapidement, toutefois, à l'obscurité. La perte en *substance sèche* augmente aussi au cours de la germination à l'obscurité; elle

I. — Variations du poids humide et du poids sec au cours de la germination de la lentille à l'obscurité. Expérience portant sur cinq lots de 400 lentilles.

DURÉE DE LA GERMINATION	POIDS humide en grammes	POIDS sec en grammes	PERTE de substance sèche o/o	EAU de la plante fraîche o/o
Avant germination. . . .	29,3	25,8	»	13
Premier stade (2 jours). .	62,5	25,3	0,2	59
Deuxième stade (3 jours). .	67	24	7,5	64,1
Troisième stade (6 jours). .	77,7	23,03	12	70
Quatrième stade (9 jours). .	115	23,17	11,3	79,8

II. — Variations des composés phosphorés au cours de la germination de la lentille à l'obscurité. Expérience portant sur cinq lots de 400 lentilles.

DURÉE de la germination	PHOSPHORE LIPIDIQUE en milligrammes	PHOSPHORE NUCLÉIQUE en milligrammes	PHOSPHORE PHYTIQUE en milligrammes	PHOSPHORE MINÉRAL en milligrammes	PHOSPHORE LIPIDIQUE o/o du phosphore total	PHOSPHORE NUCLÉIQUE o/o du phosphore total	PHOSPHORE PHYTIQUE o/o du phosphore total	PHOSPHORE MINÉRAL o/o du phosphore total
Avant germ. . .	12,67	10,4	50,63	18,30	13,7	11,3	55	20
1 ^{er} stade (2 j.).	12,09	10,1	45,9	23,63	13,1	11	49,9	25,6
2 ^e stade (3 j.).	10,85	10,7	42,07	28,08	11,8	11,6	45,7	30,5
3 ^e stade (6 j.).	9,39	12,38	15,54	52,91	10,4	13,7	17,2	58,7
4 ^e stade (9 j.).	9,10	15,39	0	62,81	10,4	17,6	0	72

atteint d'ailleurs un chiffre plus élevé qu'en germination à la lumière.

2° Comme dans la première expérience, le *phosphore lipidique* a disparu plus rapidement qu'à la lumière. Au troisième stade, après six jours, alors qu'à la lumière la diminution n'était encore que de 20 o/o, déjà à l'obscurité la diminution atteignait 26 o/o.

3° Pour le *phosphore nucléo-protéidique*, nous assistons au même phénomène qu'en présence de lumière. Nous voyons le phosphore nucléique passer de 10 milligr. 4 avant germination, à 12,38 au bout de six jours, soit une augmentation de 15 o/o,

puis à 15 milligr. 39 au bout de neuf jours, ce qui représente une augmentation de plus de 50 % sur le chiffre initial.

4° Quant au *phosphore phytinique*, il subit le même sort à l'obscurité qu'à la lumière. Peut-être disparaît-il un peu moins rapidement, mais c'est encore ici pour donner, comme à la lumière, du *phosphore minéral* qui atteint, ici aussi, 70 % du phosphore total à la fin de la période expérimentale.

En résumé, nous ne percevons pas de différences fondamentales dans le métabolisme des composés phosphorés à la lumière et à l'obscurité.

Parmi ces composés, il en est qui semblent être des formes de réserve puisqu'elles disparaissent très rapidement dès le début de la germination. Le *phosphore phytinique*, par exemple, n'existe plus dès le neuvième jour de la germination à la lumière et à l'obscurité. Nous sommes là parfaitement d'accord avec nos prédécesseurs.

BERNARDINI et MORELLI (1912), dosant la phytine soluble dans l'acide chlorhydrique à 1 % au cours de la germination du froment, ont trouvé que ce composé n'existait plus qu'à l'état de traces au moment où la tige mesurait 10 cm. de haut. Ces auteurs précipitaient la phytine par l'acétate de cuivre.

IWANOW (1902), étudiant la variation des composés phosphorés chez la fève, voit la phytine passer de 25,7 à 5,1 au bout de vingt jours de germination.

ZLATAROW (1916), étudiant *Cicer arietinum* L., voit la phytine passer de 25 % du phosphore total à 1 % au bout de six jours.

Plus récemment, de TURCK, HOLBERT et HOWK (1933), étudiant par la méthode d'HEUBNER et STADLER (*loc. cit.*) l'hydrolyse de la phytine, au cours de la germination du maïs, signalaient qu'au bout de six jours la quantité de phytine ne représentait plus que 55 % du phosphore total, alors qu'au début de l'expérience elle en représentait 88 %. Ces auteurs n'ont pas poussé plus loin leurs essais, la méthode d'HEUBNER manquant de précision à partir de ce moment.

Si la phytine nous apparaît comme un phosphore de réserve, il est difficile d'assigner ce rôle aux *phospho-lipides* qui, eux, semblent être d'une plus grande constance. Nous n'assistons pas à leur disparition complète et même à la lumière, il nous

semble être en présence d'un phénomène de synthèse de ces composés.

D'ailleurs, sur milieu nutritif, REWALD (1929) a pu montrer qu'au bout de cinq semaines les graines de soja ont sensiblement la même teneur en phosphatides. Les observations qui résultent de notre travail sur la lentille se trouvent donc en accord avec les observations faites sur d'autres végétaux par nos prédécesseurs.

Il n'est peut-être pas sans intérêt de remarquer que notre travail apporte des résultats basés sur des techniques plus poussées. En ce qui concerne le phosphore phytinique, l'expérience de BERNARDINI et MORELLI (1912) sur le froment n'était pas sans laisser place à quelque critique, puisque les sels de cuivre précipitent tout autre chose que la phytine. L'extraction des composés phosphorés solubles par l'acide acétique à chaud qu'employait IWANOW (1902) était incapable d'enlever totalement ces composés. L'expérience de de TURCK, HOLBERT et HOWK (1933), plus récente, ne donne pas entière satisfaction du fait que, par un défaut de la méthode, l'expérience ne put être prolongée au delà du sixième jour. A ce moment, il restait d'ailleurs encore dans la graine une grande quantité de composés phytiniques, environ les 2/3.

En utilisant notre méthode de dosage de la phytine, nous avons pu reprendre sur une autre espèce ces expériences et les pousser un peu plus loin. Nous avons mis en évidence l'absence de phytine dans la lentille au bout de neuf jours de germination.

L'originalité de notre travail réside aussi dans la mise au point de la méthode d'extraction et de précipitation du phosphore nucléo-protéidique et dans l'application de son dosage dans un certain matériel végétal : le germe de blé, la graine de lentille, la graine de tournesol. Cette technique nous a permis d'assister à une formation de ces composés phosphorés durant les premiers stades de la vie de la jeune plantule.

Troisième germination. — Malgré les résultats très nets précédemment obtenus, il pouvait être utile de recommencer une expérience de contrôle afin d'obtenir confirmation des faits.

Pour ne pas nous écarter de la technique, nous avons pris la même graine et nous l'avons fait germer dans des conditions

aussi semblables que possible. Nous n'avons toutefois opéré qu'à la lumière, l'expérience précédente ayant montré le paralélisme dont nous avons parlé plus haut.

Nous avons tâché de tirer de nouveaux enseignements des faits que nous observions. Pour cela, nous avons espacé nos prélèvements et avons fait durer l'expérience douze jours : du 23 juin au 4 juillet.

Chacun des prélèvements porta sur 325 graines. Pour la commodité de la pulvérisation de notre matériel, nous avons opéré sur des graines décortiquées aussitôt après leur prélèvement, avant la stabilisation.

Au lieu de nous servir de sable lavé, nous avons placé nos graines sur des feuilles de papier filtre imbibé d'eau redistillée.

Le poids sec a été obtenu par séchage de 100 graines à l'étuve à 100° jusqu'à poids constant.

Nous avons, cette fois, desséché nos lipides plus rapidement que dans l'expérience précédente en nous basant sur les propriétés de distillation des mélanges ternaires. On a constaté depuis assez longtemps qu'un mélange en proportions convenables de benzène, d'alcool et d'eau donne tout d'abord à la distillation un mélange ternaire qui entraîne toute l'eau, si bien qu'au bout d'un certain temps il ne reste plus dans l'appareil que de l'alcool et du benzène, qui distillent à leur tour.

Ce procédé est utilisé dans l'industrie pour préparer de l'alcool absolu en partant d'alcool à 96°.

Le mélange ternaire : eau, alcool, benzène, présente un point d'ébullition minimum pour une composition voisine : eau 7, alcool 18, benzène 75, à la température de 64°5.

Exemple. — Soit un extrait alcoolique de stabilisation et d'extraction de 322 cm³ contenant 17 gr. d'eau, calculés grâce au poids sec : nous ajoutons $\frac{17 \times 75}{7} = 185$ de benzène. La

quantité d'alcool à ajouter étant de $\frac{17 \times 18}{7} = 44$ cm³ est lar-

gement dépassée dans le mélange ; il nous suffit donc d'ajouter le benzène et de distiller. Les premières portions passent à 64°5, elles montent dans la colonne à distiller en un liquide clair et limpide, qui se trouble aussitôt qu'il a gagné le réfrigérant. Le

mélange homogène à 64°5 ne l'est plus à une température inférieure et les composants se séparent plus ou moins, séparation qui est limitée par la solubilité de l'eau dans l'alcool. Peu à peu, on voit la température s'élever progressivement jusqu'à 77° et demeurer telle jusqu'à la fin de l'opération.

On obtient un résidu sensiblement sec. On le dessèche complètement au moyen de deux affusions de quelques centimètres cubes d'alcool absolu.

Ce procédé possède l'avantage, sur le procédé d'entraînement de l'eau par le toluène, de nécessiter une moindre élévation de température qui pourrait nuire aux composés phosphorés.

Cette petite modification mise à part, nous avons fait la séparation des composés phosphorés comme dans la germination précédente : aussi nous résumons les résultats expérimentaux dans le tableau suivant (voir page 104).

CONSTATATIONS EXPÉRIMENTALES. — 1° Cette expérience a donc confirmé nos premiers résultats.

Dès le quatrième jour après le début de la germination dans des conditions optima de température, on voit le phosphore nucléique augmenter de 10 %. Au bout de huit jours, on arrive au maximum avec une augmentation de 50 %.

Nous assistons ensuite à une chute assez sensible, puisque quatre jours après, nous revenons au chiffre d'avant germination. A ce moment, si nous examinons notre tableau il ne reste d'ailleurs plus de phytine dans la graine. Peut-on en conclure que la phytine sert à la plante pour fabriquer ses composés nucléo-protéidiques? Il est fort possible. POSTERNAK pense que pendant la germination de la graine, l'hexaphosphate commence par perdre une grande partie de ses acides phosphoriques et que ce sont ces esters inosito-phosphoriques inférieurs qui, en se décyclisant, se transforment en d'autres composés, parmi lesquels les nucléotides occupent une place prépondérante.

Remarquons, toutefois, la disproportion qui existe entre la quantité de phosphore phytinique contenue dans la graine au début de la germination, 55 milligr., et la quantité relativement faible de phosphore nucléo-protéidique formée au cours des premiers stades : 3 milligr. 5. Il est évident que les chiffres obtenus dans notre germination sur eau distillée ne peuvent

Variations des composés phosphorés au cours de la germination de la lentille à la lumière. (Expérience portant sur quatre lots de 325 lentilles.)

I. — Variation des poids humides et secs.

DURÉE DE LA GERMINATION	POIDS humide en grammes	POIDS sec en grammes	PERTE de substance sèche o/o	EAU de plante fraîche o/o
Avant germination.	26,63	23,70	»	44
Premier stade (5 jours).	64,81	22,53	5,33	48,6
Deuxième stade (8 jours).	87	22,15	7	74,6
Troisième stade (12 jours).	111	20,70	14,50	81,3

II. — Variations du phosphore total, phosphore lipidique, phosphore nucléique, phosphore phytinique, phosphore minéral.

DURÉE de la germination	PHOSPHORE TOTAL mg.	PHOSPHORE LIPIDIQUE mg.	PHOSPHORE RESTANT mg.	PHOSPHORE SOLUBLE C1Na mg.	PHOSPHORE NUCLÉIQUE mg.	PHOSPHORE PHYTIKIQUE mg.	PHOSPHORE MINÉRAL mg.	PHOSPHORE LIPIDIQUE du phosphore total o/o	PHOSPHORE NUCLÉIQUE du phosphore total o/o	PHOSPHORE PHYTIKIQUE du phosphore total o/o	PHOSPHORE MINÉRAL du phosphore total o/o
Avant germination, 23 juin. . .	112	12	100	89	11,2	55,2	33,6	10,7	10	49,4	30
1 ^{er} stade, 27 juin. . .	111	10,3	101	97	12,8	31,2	46,7	9,3	11,3	28,1	51,4
2 ^e stade, 30 juin. . .	110	9,5	101	98	14,9	13,9	62,7	8,6	13,3	12,6	65,3
3 ^e stade, 4 juill. . .	105	8,9	96	96	11	0	78,5	8,4	10	0	81,6

représenter fidèlement les phénomènes qui se passeraient dans les circonstances naturelles. Les poids secs de nos graines diminuent au fur et à mesure de la germination, nos jeunes plantules peuvent donc manquer de certains principes nécessaires à l'édification de nouveaux tissus.

Quoi qu'il en soit, nous avons pu assister à la synthèse des nucléo-protéides au cours des premiers stades de la germination. Nos expériences sont en accord avec celles de KARAPETOFF et SABACHNIKOFF (1902) qui à l'aide d'une technique différente ont montré que, dans les premiers stades de la germination de l'orge et du froment, les matières protéiques *non digestibles*

augmentent et ce n'est qu'après un jeûne prolongé qu'elles diminuent.

ZALESKI (1912) a montré également que, dans les jeunes plantules, le phosphore protéique augmente d'une façon importante, puisque au cours des premiers stades de la germination du troisième au neuvième jour il passe de 12,5 à 33,7 % du phosphore total.

Par contre, nous ne sommes pas en accord parfait avec IWANOW (1902) et ZLATAROFF (1916). Nous avons montré plus haut pourquoi : la méthode de détermination du phosphore nucléique de ces deux auteurs par reste ne pouvait pas leur permettre de suivre des variations qui en valeur absolue ne sont toutefois pas énormes.

Nous insistons sur le point suivant : l'édifice nucléo-protéique paraît se constituer également à la lumière et à l'obscurité, tant que certaines réserves n'ont pas encore disparu.

Ce phénomène est à rapprocher de celui de la formation des matières protéiques qui, comme l'ont démontré certains auteurs dont SUZUKI, KINOSCHITA (1895), ZALESKI (1898), GOLDBERG (1899), PRIANISCHNIKOFF (1899), PALLADINE (1899), HANSTEEN (1899), MALINIAK (1900), peuvent se former à l'obscurité à condition qu'il y ait une source de carbone, des glucides.

2° En ce qui concerne les autres composés phosphorés : les phospho-lipides, phytine, phosphore minéral, ils subissent dans cette germination le même sort que plus haut.

3° Le phosphore total reste relativement constant durant toute la durée de l'expérience. Au bout de douze jours, il a seulement baissé de 5 %.

4° Après délipidation, le phosphore restant dans la poudre n'est pas, avant germination, complètement soluble dans la solution de chlorure de sodium. L'insoluble égale 10 % environ. Cette quantité va en diminuant au fur et à mesure de la germination. Une forme de phosphore insoluble semble se solubiliser.

CHAPITRE V

FORMATION DES COMPOSÉS PHOSPHORÉS AU COURS DE LA MATURATION DE LA GRAINE DE TOURNESOL

Les résultats obtenus à l'aide de nos méthodes de dosage des composés phosphorés au cours de la germination de la lentille appelaient d'autres recherches non moins intéressantes : l'étude de la formation de ces mêmes composés dans la graine qui mûrit.

Nous aurions bien voulu entreprendre cette étude sur la même graine qui nous a servi aux études de ces composés au cours de la germination. Pour des raisons de commodité, nous nous sommes adressés à une autre graine plus riche en composés phosphorés que nous avons à notre disposition dans les jardins avoisinant notre hôpital : la graine d'*Helianthus annuus* L.

Nous étions là en présence de l'akène d'*Helianthus* dont il était facile de séparer la graine, et c'est celle-ci que nous avons étudiée au moment où le péricarpe ne contenait plus de phosphore. Nous avons attendu que l'amande fût assez riche en composés phosphorés pour permettre les dosages de façon correcte.

C'est ainsi que pendant une période de quatorze jours, nous avons suivi l'augmentation du phosphore total en faisant sur une inflorescence des prélèvements de 20 fruits dont nous séparions les graines. Cette expérience n'avait d'autre but que de nous permettre de connaître le moment où les composés phosphorés arriveraient à un taux voisin du maximum. A ce moment

seulement, les composés nucléo-protéidiques et lipidiques étaient en quantité suffisante pour permettre un dosage.

Voici les chiffres de phosphore total obtenus dans chacun de ces prélèvements.

DATE DU PRÉLÈVEMENT	POIDS de 20 graines humides en grammes	POIDS de 20 amandes en grammes	POIDS de 20 péricarpes en grammes	PHOSPHORE TOTAL des 20 amandes en milligrammes	PHOSPHORE TOTAL pour 100 gr. de graines fraîches en milligrammes
3 septembre, 1 ^{er} prélèvement .	2,738	1,044	1,694	4,30	440
4 septembre, 2 ^e prélèvement .	2,734	1,106	1,628	4,44	401
10 septembre, 3 ^e prélèvement .	2,756	1,246	1,510	6,40	519
16 septembre, 4 ^e prélèvement .	3,344	1,698	1,646	9,60	568

Le premier et le second prélèvement ont été effectués au moment où la tige était encore verte et bien dressée; la corolle était encore d'un jaune étincelant marquant la pleine floraison. Au troisième prélèvement, la tige et les feuilles commençaient à jaunir. Enfin, au quatrième, les feuilles et la tige étaient bien jaunes.

Nous avons opéré parallèlement deux prélèvements de 300 fruits sur deux pieds voisins dont les périodes de maturité se rapprochaient, autant qu'il était possible de s'en rendre compte, des stades nos 3 et 4 précédents, en vue d'y doser les différents principes immédiats phosphorés.

Les graines ont été séparées des fruits et aussitôt stabilisées comme nous l'avons fait pour les plantes germées. Une partie toutefois était mise de côté en vue d'établir le poids sec par entraînement au toluène.

La suite des opérations a été menée comme nous l'avons rapporté au sujet du dosage des composés phosphorés de la graine mûre.

L'extraction des lipides a été faite au Kumagawa. L'extraction du phosphore nucléo-protéidique a été faite par le chlorure de sodium et le phosphore phytinique a été dosé en solution trichloracétique.

Nous résumons, dans les deux tableaux suivants, les résultats

obtenus et pour nous permettre de suivre l'évolution de ces composés jusqu'à maturité complète, nous avons ajouté dans une troisième colonne les chiffres de phosphore de la graine mûre :

Variations du phosphore total; du phosphore soluble dans le chlorure de sodium; du phosphore soluble dans l'acide trichloracétique à 10 % à trois périodes différentes de la maturation de la graine de tournesol.

	POUR 300 GRAINES			POUR 100 GR. de matière sèche		
	1 ^{er} stade	2 ^e stade	Graine mûre	1 ^{er} stade	2 ^e stade	Graine mûre
	grammes	grammes	grammes			
Poids humide.	22,75	16,64	18,30			
Poids sec.	17,41	14,56	17,02			
Poids des lipides	7,75	7,63	9,16	44,5	52,4	53,8
P. total.	0,142	0,118	0,122	820	802	717
P. lipidique.	0,118	0,00355	0,00265	6,77	24,35	15,58
P. soluble dans ClNa. . .	0,0645	0,0543	0,0492	370	372	289
P. insoluble dans ClNa. .	0,0772	0,0602	0,0701	438	413	412
P. soluble dans l'acide trichloracétique. . . .	0,1384	0,1122	0,115	794	769	676
P. insoluble dans l'acide trichloracétique. . . .	0,0024	0,0023	0,0043	13,8	15,7	25,3

Variations des différentes formes de phosphore de la graine d'*Hélianthus annuus* à trois périodes différentes de la maturation.

	POUR 300 GRAINES			POUR 100 GR. de matière sèche			POUR 100 GR. du P. total		
	1 ^{er} stade	2 ^e stade	Graine mûre	1 ^{er} stade	2 ^e stade	Graine mûre	1 ^{er} stade	2 ^e stade	Graine mûre
	milligr.	milligr.	milligr.	milligr.	milligr.	milligr.			
P. total . . .	142	118	122	820	802	717			
P. lipidique .	1,18	3,55	2,65	6,77	24,35	15,58	0,83	3	2,47
P. nucléique .	2,11	3,05	5,49	12,11	20,92	32,3	1,41	2,58	4,50
P. phytinique.	125	100	100	718	686	550	88	81,7	81,9
P. restant . .	14	12	14	80	82	119	10	10	11,4

CONSTATATIONS EXPÉRIMENTALES. — Il peut paraître, au premier abord, difficile de comparer nos trois séries de résultats et certes

nous aurions bien voulu exécuter nos trois expériences sur la même inflorescence.

Si l'on prête un peu attention on peut toutefois tirer d'importantes conclusions de ces résultats.

Dans nos deux premiers prélèvements, le phosphore total pour 300 graines fraîches est assez différent, mais si au lieu de prendre comme unité 300 graines, nous calculons les quantités de phosphore pour 100 gr. de poids sec, nous voyons que les quantités de phosphore total sont assez voisines. Ces deux lots de graines qui sont certainement à un stade différent de maturation puisque leur teneur en eau est différente, et le degré de jaunissement des organes nous le montre aussi, ont à peu près la même quantité de phosphore total.

Les quantités de composés phosphorés solubles dans l'acide trichloracétique à 10 %, atteignent aussi dans les deux stades des valeurs sensiblement égales par rapport au phosphore total, puisque dans l'un et l'autre cas elles sont de 98 et 95 % du phosphore total.

Donc, à deux stades de maturation inégalement avancés, le rapport du phosphore soluble dans l'acide trichloracétique qui est constitué en grande majorité par de la phytine, au phosphore total, est à peu près le même. Il atteint d'emblée une valeur importante. Il n'en est pas de même des autres formes de phosphore que nous avons déjà eu l'occasion d'envisager. Le phosphore lipidique, assez faible dans les deux cas puisqu'il n'atteint que 0,82 % et 3 % du phosphore total, augmente dans cette période de maturation. Si ses valeurs absolues demeurent faibles, elles semblent tripler toutefois.

Quant au phosphore nucléique de valeur excessivement faible également, il augmente aussi dans de fortes proportions.

Comparons maintenant les quantités de composés phosphorés de la graine mûre.

Les quantités de phosphore total diminuent. Nous avons 717 milligr. de phosphore total au lieu de 820 et 802. Mais nous sommes ici en présence d'une graine qui a construit complètement son édifice lipidique alors qu'il n'était qu'en formation dans nos premiers stades. Il y a pour 17 gr. de substance 1 gr. 50 de matière grasse en plus, soit 9 % environ en plus. Si nous faisons abstraction de cette graisse, nous trou-

vons un chiffre de phosphore qui se rapproche du chiffre de nos deux premiers stades.

Envisageons, par exemple, nos poudres traitées par l'alcool et l'éther, autrement dit délipidées; elles présentent le même pourcentage de phosphore total. Dans notre graine mûre, le phosphore total n'a donc diminué que parce que les matières grasses ont augmenté. C'est d'ailleurs ce que montre le tableau suivant :

Quantités de phosphore total de nos poudres de graines de tournesol délipidées.

	1 ^{er} STADE	2 ^e STADE	GRAINE mûre
	grammes	grammes	grammes
Quantité de poudre délipidée pour 300 graines	8,44	6,40	6,41
Phosphore total de cette poudre .	0,14162	0,11525	0,11935
Phosphore total pour 100 gr. de poudre délipidée.	1,796	1,889	1,936

Dans la graine mûre, le chiffre le plus important qui représente 94 % du phosphore total, est constitué par du phosphore soluble dans la solution trichloracétique en grande partie phytinique.

Si on envisage la quantité de phosphore lipidique, elle a légèrement baissé après avoir monté. C'est un fait analogue qu'ont noté tout récemment MM. MANCEAU, REVOL et CHARMILLON, qui ont étudié la formation des phospho-aminolipides dans le marron d'Inde.

Une forme de phosphore a continué à croître, c'est le phosphore nucléique, qui, de 3,05 a passé à 5,40.

D'où provient cette augmentation de la phytine? Il y en a en assez grande quantité pour cela. Pourtant notre graine ne semble pas lui faire dans ce cas de grands emprunts.

Peut-être provient-elle des phospho-lipides dont la perte est peut-être plus explicable de cette façon.

Quoi qu'il en soit, de cette expérience, qui ne peut être considérée que comme un essai d'application de techniques déjà utilisées pour l'étude de la germination, je ne veux dégager

qu'une idée importante et qui semble très nettement établie.

La plus grande quantité de phosphore dans la graine d'*Helianthus* est constituée par de la phytine. Cette phytine apparaît comme le premier composé phosphoré formé dans notre graine.

Elle a atteint son chiffre maximum, environ 90 % du phosphore total alors que le phosphore lipidique et le phosphore nucléique n'ont encore fait que leur apparition.

C'est seulement après, que ces deux formes de phosphore augmentent à leur tour dans de fortes proportions.

Ces premiers essais, tout imparfaits qu'ils soient, nous fixent toutefois sur l'ordre d'apparition des composés phosphorés dans la graine d'*Helianthus* :

1° La phytine est le premier terme qui apparaît dans notre graine ;

2° Les phospho-lipides semblent apparaître ensuite et atteindre leur maximum en deuxième rang ;

3° Les composés nucléiques n'arrivent à leur maximum qu'après tous les autres composés.

CONCLUSIONS

Dans ce travail, je m'étais donné comme but l'étude des méthodes de détermination quantitative des principes phosphorés des graines à l'état de repos et des graines germées. Il s'agissait particulièrement de doser le phosphore lipidique, le phosphore nucléique et le phosphore phytinique de ces graines et des plantules qui en sont issues. Je pensais, quand j'ai commencé ces recherches, appliquer les techniques que j'avais établies à un nombre suffisamment élevé de graines et de germinations. Mais les seules études techniques sont longues et nécessitent la vérification d'une infinité de détails.

Voici les faits essentiels que j'ai observés :

I. TECHNIQUES. — a) *Phosphore lipidique* : La technique d'extraction doit consister en une lixiviation prolongée par l'alcool bouillant, puis par l'éther, du matériel d'étude stabilisé par l'alcool et convenablement divisé. L'extrait éthéro-alcoolique bien déshydraté est repris successivement par l'éther anhydre et par le benzène anhydre. Le phosphore lipidique est dosé dans le résidu de la solution éthéro-benzénique par la méthode du complexe phospho-éthéro-molybdique de COPAUX.

La durée de l'extraction alcoolique varie suivant la matière première.

La bonne dessiccation de l'extrait alcool-éthéré est un stade important de la technique.

b) *Phosphore nucléique*. — La technique établie par JAVILLIER et ALLAIRE pour le dosage du phosphore nucléique (plus exactement nucléo-protéidique) dans les tissus animaux s'applique au matériel végétal que j'ai étudié. La matière première, délipidée

et réduite en poudre fine, est traitée pendant trente minutes à l'ébullition et en agitant, avec une solution de chlorure de sodium à 12,5 % additionnée de 0,5 % de triacétide. Tout ce qui peut être légitimement qualifié de phosphore nucléo-protéidique passe d'emblée en solution. Pour tout matériel nouveau d'étude, il sera opportun de le vérifier.

La précipitation s'effectue par l'acide chlorhydrique. J'ai montré que les conditions de cette précipitation sont extrêmement importantes à préciser. Il convient de réaliser un certain pH pour que, d'une part, tout ce qui doit être compté comme nucléique, soit précipité et pour que, d'autre part, l'on ne risque pas de redissoudre de la matière insolubilisée. A $\text{pH} = 2$ nous précipitons les composés nucléiques extraits du germe de blé ou ceux extraits de la graine de tournesol; pour ceux de la graine de lentille, il faut une acidité un peu plus forte, correspondant à $\text{pH} = 1$. Dans les conditions réalisées et pour le matériel étudié, il n'y a pas de composés phytiniques dans le précipité, donc point de cause d'erreur de ce fait. Il convient de rappeler que des nucléotides libres, s'il en existait, ne seraient pas précipités, que l'expression phosphore nucléique (ou mieux phosphore nucléo-protéidique) revêt dès lors le sens précis que M. JAVILLIER a entendu lui donner.

c) *Phosphore phytinique*. — L'ester hexaphosphorique de l'inosite, dont la phytine est une combinaison calcico-magnésienne, précipite très bien dans la liqueur chlorurée précédente dont on a éliminé le phosphore nucléo-protéidique, au moyen du chlorure ferrique dilué, en milieu légèrement acidifié par l'acide chlorhydrique. La méthode indiquée par HEUBNER et STADLER est très utilement perfectionnée en recueillant le précipité ferrique, en minéralisant et dosant le phosphore suivant COPAUX.

J'ai étudié de près les meilleures conditions de précipitation du phytinate ferrique. Les résultats sont bons avec des solutions pures de phytine. Les esters inférieurs de l'inosite ne seraient pas justiciables, d'après POSTERNAK, de cette méthode de dosage.

J'ai vérifié que, dans les conditions de dilution où nous opérons, l'on ne risque pas de précipiter sous forme de combinaisons ferriques, les nucléotides qui pourraient se trouver dans le milieu et qui n'auraient pas été éliminés lors de la

précipitation chlorhydrique utilisée pour le dosage du phosphore nucléique.

Le traitement de la matière première délipidée par la solution chlorosodique dans les conditions prescrites ne suffit pas à enlever la totalité des principes phosphorés qui y subsistent. Il reste encore de 5 à 10 % du phosphore total dans le cas du germe de blé ou de la graine de lentille et une proportion considérable, près de 60 %, dans le cas de la graine de tournesol. Des extractions répétées améliorent ces résultats mais assez peu. Avec la graine de tournesol, 50 % du phosphore total restent encore insolubilisés après deux traitements au chlorure de la poudre délipidée. Ces déficits s'expliquent d'abord par le fait que les matières premières étudiées peuvent renfermer des substances phosphorées naturellement insolubles dans un milieu neutre ou peu acide et, de ce fait, il suffit dans le cas du germe de blé d'abaisser le pH de la liqueur d'extraction à pH 4,8 pour extraire la totalité des composés phosphorés. Mais une telle liqueur d'extraction ne convient pas par la suite au dosage du phosphore nucléique et au dosage du phosphore phytinique.

Dans le cas de la graine de tournesol, nous avons vu que le traitement de la poudre privée de ses lipides par une solution à 10 % d'acide trichloracétique conduit à l'extraction de tout ce qui reste de composés phosphorés, à l'exclusion des composés nucléiques. Il nous paraît raisonnable d'envisager que les déficits auxquels nous avons fait allusion seraient dus, pour une large part, à l'existence d'associations : composés phytiniques-substances protéiques, qui ne livrent pas leur phytine à la seule solution aqueuse et seraient dissociées par l'acide trichloracétique.

Dans la liqueur trichloracétique, le phosphore phytinique est précipitable par le chlorure ferrique à froid et dosable, comme il a été précédemment rappelé. C'est là la méthode de choix pour le dosage du phosphore phytinique.

d) *Phosphore minéral*. — Dans les solutions chlorurées d'extraction, nous avons cherché à doser le phosphore minéral ; mais ces solutions renferment des substances protéiques que les déféquants utilisés n'ont pas suffi à éliminer ; l'ultrafiltration sur collodion n'a pas conduit à des résultats satisfaisants

et n'a pas non plus permis la séparation des phosphates minéraux et de la phytine. La phytine traversait la membrane ultrafiltrante.

Après extraction trichloracétique, j'ai dosé dans cette liqueur trichloracétique le phosphore minéral dans le cas du germe de blé. Avec le même extrait obtenu avec la graine de tournesol, je n'ai pas constaté la présence de phosphates minéraux.

II. RÉSULTATS EN CE QUI CONCERNE LE GERME DE BLÉ, LA GRAINE DE LENTILLE, LA GRAINE DE TOURNESOL. — J'ai poursuivi mon étude technique sur trois matières premières : 1° le germe du blé, que j'ai choisi de préférence au grain entier parce que la surcharge amylacée créait avec le grain une évidente complication expérimentale ; 2° la graine de lentille, dont j'ai pu me procurer dans le commerce une poudre totale très fine ; 3° la graine d'*Helianthus annuus*.

Voici les résultats qui intéressent ces trois substances :

Le germe de blé est, comme chacun sait, très riche en phosphore.

L'échantillon étudié titrait 1 gr. 350 P. % de matière sèche.

La graine de lentille titrait 0 gr. 380 P. % ; la graine d'*Helianthus*, 0 gr. 716 %.

Dans ces 3 cas, la forme de phosphore la plus abondante a été la forme *phytinique* : 77 % du phosphore étaient inclus sous forme de phytine dans la graine d'*Helianthus*, 50 % chez la lentille, 47 % chez le germe de blé.

Le *phosphore nucléique* représente 30 % du phosphore total du germe de blé ; l'importance quantitative de celui-ci était naturellement attendue dans un embryon ; l'on sait, du reste, que de l'embryon de blé l'on extrait un acide triticonucléique identique à l'acide nucléique de levure. Dans la lentille, le phosphore nucléique atteint 44 % du phosphore total, dans la graine d'*Helianthus*, il n'en représente que 5 %.

Les composés phosphorés relevant analytiquement du groupe des lipides ne sont pas très abondants dans aucun de nos échantillons. Le *phosphore lipidique* compte pour 12 % du P total chez la lentille, pour 7 % chez le germe de blé, pour 2 % dans la graine d'*Helianthus*. On remarquera la faible teneur de

cette dernière graine en phosphore lipidique, alors que son extrait lipidique est élevé (60 % de la matière première).

III. ÉVOLUTION DES COMPOSÉS PHOSPHORÉS AU COURS DE LA GERMINATION. — Cette étude a été faite sur des germinations de lentilles. Dans une première période, les *phospho-amino-lipides* diminuent assez peu, particulièrement dans les germinations faites à la lumière. Dans une deuxième période, on assiste à une baisse plus prononcée, cette chute étant moins accentuée à la lumière qu'à l'obscurité. Il est évident que la plantule, d'une part, utilise des réserves de phosphore lipidique et, d'autre part, en resynthétise.

Les *composés nucléiques* augmentent au cours de la germination faite sur un milieu cependant non nutritif ; le coefficient d'augmentation est de même ordre dans les germinations effectuées à la lumière ou à l'obscurité : 50 % environ pour les périodes expérimentales réalisées.

La phytine disparaît rapidement pendant la germination (une dizaine de jours) : cette forme essentielle de réserve phosphorée va jusqu'à disparaître complètement.

Nous nous permettrons de souligner que c'est l'application des techniques que nous avons étudiées qui nous a permis de suivre commodément l'évolution des composés nucléiques et phytiniques au cours du phénomène de germination. Le sort des trois types de principes étudiés est franchement différent : utilisation et resynthèse des phospho-lipides, synthèse des composés nucléiques, utilisation intégrale de la phytine.

IV. FORMATION DES COMPOSÉS PHOSPHORÉS AU COURS DE LA MATURATION DE LA GRAINE. — Cette étude a été faite sur la graine d'*Helianthus annuus*.

Les *phospho-amino-lipides* apparaissent tardivement, augmentent lentement, diminuent ensuite et stabilisent enfin le phosphore lipidique à un certain taux dans la graine mûre. C'est un phénomène analogue à celui qu'a décrit TERROINE dans sa mise au point de 1920 à propos de la formation des lipides dans le fruit. Ceux-ci apparaissent dans une première phase de développement du fruit, puis subissent une brusque augmentation et se stabilisent pendant une longue période. A la maturité,

se produit une faible diminution du taux des matières grasses.

Les composés nucléiques augmentent au fur et à mesure que progresse la maturation. Au deuxième stade de nos observations, le phosphore nucléique a doublé; la quantité en est, à la maturité, le triple de ce que nous avons déterminé au début de l'expérience.

Quant au phosphore phytinique, l'on en trouve déjà beaucoup dès le premier stade étudié. Avant que ne soient présents dans la graine des phospho-amino-lipides, constituants cytoplasmiques et réserves, avant même que ne s'accroissent les composés nucléiques, constituants nucléaires essentiels, la phytine s'accumule. C'est là, nous semble-t-il, le phénomène le plus important. La phytine, que l'on peut se représenter comme une forme de réserve facilement mobilisable, tout à la fois de phosphore, de matière sucrée et de matière minérale, s'accumule hâtivement lors de la maturation, tandis qu'elle s'hydrolyse rapidement lors de la germination.

Telles sont nos observations. Nous espérons pouvoir les étendre plus tard à un nombre suffisant de cas particuliers pour élargir nos connaissances sur la biochimie des graines et même envisager, grâce aux techniques établies, d'autres problèmes relatifs à l'évolution des composés phosphorés chez les végétaux.

BIBLIOGRAPHIE

- ADLER (L.) : Ueber die Phosphatasen im Malz. *Biochem. Z.* 1915, **70**, 1-36.
- ADLER (L.) : Gewinnung von Phytase aus Malz. *Biochem. Z.* 1916, **75**, 319-338.
- ALEXEIEFF : Mitochondries chez quelques protistes. *C. R. Soc. Biol.*, 1916, **79**, 1076.
- ALEXEIEFF : Sur la structure des bactéries. Les mitochondries et les grains métachromatiques chez les bactéries. *C. R. Soc. Biol.*, 1923, **84**, 728.
- ALTMANN (R.) : Ueber Nucleinsäuren. *Arch. f. Anat. u. Physiol., physiol. Abht.*, 1889, 524-536.
- ANDERSON (R. J.) : Phytin and phosphoric acid esters of inosite. *Journ. Biol. Chem.*, 1912, **11**, 471-488.
- ANDERSON (R. J.) : Phytin and pyrophosphoric acid esters of inosite. *Journ. Biol. Chem.*, 1912, **12**, 97-113.
- ANDERSON (R. J.) : Concerning the organic phosphoric acid of cottonseed meal. Concerning phytin in oats. Concerning phytin in corn. *Journ. Biol. Chem.*, 1914, **17**, 141-171.
- ANDERSON (R. J.) : A contribution to the Chemistry of Phytin. I. Composition of Barium phytate and phytic acid; II. A study of the proportion of phytic acid and its decomposition products. *Journ. Biol. Chem.*, 1914, **17**, 171-191.
- ANDERSON (R. J.) : Concerning the organic phosphoric acid compound of wheat bran. Inosite monophosphate, a new organic phosphoric acid occurring in wheat bran. *Journ. Biol. Chem.*, 1914, **18**, 441.
- ANDERSON (R. J.) : Concerning the organic phosphoric acid compound of wheat bran. The occurrence of inosite triphosphate in wheat bran. *Journ. Biol. Chem.*, 1915, **20**, 463.
- ANDERSON (R. J.) : Occurrence of inosite hexaphosphoric acid in the seed of the silver Maple (*Acer Saccharinum*). *Journ. Biol. Chem.*, 1920, **43**, 469.
- ANDERSON (R. J.) : Synthesis of phytic acid. *Journ. Biol. Chim.*, 1920, **48**, 117-128.
- ARBENZ (E.) : *Mitteil. aus d. Gebiete d. Lebensmittelunters. u. Hygiene*, 1922, **13**, 45, cité par Koehler, 1926.
- ASCOLI (A.) : Ueber ein neues Spaltungsproduct des Hefenucleins. *Z. physiol. Chem.*, 1900, **31**, 161.

- AVERILL (H. P.) et KING (C. G.) : The Phytin content of foodstuffs. *Journ. Amer. Chem. Soc.*, 1926, **48**, 724-728.
- BERNARDINI (L.) : Sulla composizione chimica dell'embrione del riso. *Atti d. R. Accad. d. Lincei* (5), 1^{er} sem., 1912, **21**, 283.
- BERNARDINI (L.) et MORELLI (G.) : Sull'ufficio fisiologico del Magnesio nella pianta verde; *Atti d. R. Accad. d. Lincei* (5) 1^{er} sem. 1912, **21**, 357.
- BERTRAND (Gabriel) et SILBERSTEIN (L.) : Le soufre et le phosphore dans les diverses parties du grain de blé. *C. R. Ac. Sc.*, 1933, **197**, 285-288.
- BLEYER (B.) et DIEMAIR (W.) : Zur Kenntnis der pflanzlichen Phosphatide und Lecithine. I. Ueber ein Phosphatid der Mohrrübe, *Biochem. Z.*, 1931, **235**, 243-258. II. Ueber ein phosphorhaltigen dialysierbaren Stoff der Mohrrübe. *Biochem. Z.*, 1931, **238**, 197-211.
- BOUTWELL (P. W.) : The Phytic acid of the wheat kernel and some of its salts. *Journ. Amer. Chem. Soc.*, 1917, **39**, 491.
- CLARKE : Phytin and Phytic acid. *Journ. Chem. Soc. London*, 1914, **105**, 535.
- COCKEFAIR (E. A.) : The role of phosphorus in the metabolism of plants. *Amer. Journ. Bot.*, 1931, **18**, 582-597.
- COLIN (Y.) : Evolution des composés phosphorés au cours de la germination. Recherches expérimentales sur la lentille. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1934, **16**, p. 15.
- COLLISON : Inorganic phosphorus in plant substances. (An improved method of estimation.) *Journ. Biol. Chem.*, 1912, **12**, 65-72.
- CONTARDI (A.) : Nuovo metodo di estrazione di un composto fosforato delle piante (Fitina). *Atti d. R. Accad. d. Lincei* (5), 1^{er} sem. 1909, **18**, 64.
- CONTARDI (A.) : Sintesi dell'acido fosfoorganico dei semi delle piante. *Atti d. R. Accad. d. Lincei* (5), 1^{er} sem., 1910, **19**, 23.
- COPAUX : Procédé rapide pour doser l'acide phosphorique. *C. R. Ac. Sc.*, 1921, **173**, 656.
- CZAPEK : *Biochem. d. Pflanzen*, 1922.
- DARIC (J.) : Observations et expériences nouvelles sur le dosage rapide de l'acide phosphorique par la méthode de Copaux. *Bull. Soc. Chim.* (4), 1924, **35**, 409.
- DENIGÈS : *Précis de Chimie analytique*, Maloine, Paris, 1931.
- DE TURK (E. E.), HOLBERT (James R.) et HOWE (B. W.) : Chemical transformations of phosphorus in the growing corn plant, with results on two-first generation crosses. *Journ. Agr. Research*, 1933, **46**, 121.
- ECHEVIN (R.) et CRÉPIN (A.) : Le dosage du soufre et du phosphore dans les tissus végétaux. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1928, **10**, 1248.
- ECHEVIN (R.) : L'azote, le phosphore et le soufre chez les plantes ligneuses à feuilles caduques. *Thèse Fac. Sc. Paris*, 1931.
- ECHEVIN (R.) : L'évolution des phospholipides des feuilles au cours du jaunissement automnal. *C. R. Ac. Sc.*, 1934, **198**, 1254.
- FALK (K. G.) : A Chemical Study of Enzyme action. *Science*, **47**, 1918, 423-429.
- FEILGEN (R.) et ROSSENBECK (H.) : Mikroskopischer Nachweis einer Nucleinsäure vom Typus der Thymonucleinsäure und die darauf beruhende elektive Färbung von Zellkernen in mikroskopischen Präparaten. *Z. f. physiol. Chem.*, 1924, **135**, 203.

- FLEURY (P.) et MARQUE (J.) : Etude de l'action de l'iodomercurate de potassium en milieu alcalin sur les polyols et les corps voisins. Applications analytiques. *Journ. Pharm. et Chim.*, 1929, **10**, 241.
- FLORENCE (G.), ENSELME (J.) et POZZI (M.) : Contribution à l'étude des protéides végétaux. Sur quelques propriétés de l'édestine et de l'édestane purifiés. I. Etude de l'Edestine. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1933, **15**, 1113.
- GATTY-KOSTYAL et TESARZ (J.) : L'acide nucléique de l'ergot de seigle. *Bull. Ac. Polon. Sc. et Let.*, série B.
- GOLDBERG (J.) : Sur la formation des matières protéiques pendant la germination du blé à l'obscurité. *Rev. gén. Botan.*, 1899, **11**, 337.
- GOLDOWSKI (A.) et BOZHENKO : The phosphorus containing compounds in the sunflower seed. *Masloboino-Zhirovoe Delo*, 1932, **10**, 21.
- GRAFE (V.) et HORVAT (V.) : Zur Physiologie und Chemie der Pflanzen-Phosphatide. I. Die wasserlöslichen Phosphatide aus der Wurzel der Zuckerrübe. *Biochem. Z.*, 1925, **159**, 449-457.
- GRAFE (V.) et MAGISTRIS (H.) : II. Die wasserlöslichen Phosphatide aus *Aspergillus oryzae*. *Biochem. Z.*, 1925, **162**, 366.
- GRAFE (V.) et MAGISTRIS (H.) : III. Die wasserlöslichen und wasserunlöslichen Phosphatide aus *Pisum arvense unicolor*. *Biochem. Z.*, 1926, **176**, 266.
- GRAFE (V.) et MAGISTRIS (H.) : Ueber den Zusammenhang von Vitaminwirkung und Oberflächenaktivität der Phosphatide. *Biochem. Z.*, 1926, **177**, 16.
- GRAFE (V.) et MAGISTRIS (H.) : Ueber die Phosphatide aus *Daucus Carota*. *Planta*, 1926, **2**, 429-437.
- GRAFE (V.) et OSE (K.) : Qualitative Aufarbeitung der wässerigen Dialysate der Sojabohne (*Glycine hispida*). *Biochem. Z.*, 1927, **187**, 102-113.
- HANSTEEN (B.) : Ueber Eiweiss Synthese in grünen Phanerogamen. *Jahrbücher f. wissenschaft. Botan. B.*, 1899, **33**, n° 3.
- HARDEN (A.) et YOUNG (W. J.) : The alcoholic ferment of yeast-juice. III. The function of phosphates in the fermentation of glucose by yeast-juice. *Proc. Roy. Soc. London B.*, 1908, **80**, 299-311.
- HART (E. B.) et ANDREWS (W. H.) : *New-York Agr. Exp. Sta. Bull.*, 1903, n° 238, cité par Koehler (1926).
- HART (E. B.) et TOTTINGHAM (W. E.) : The nature of the acid soluble phosphorus compounds of some important feeding materials. *Journ. Biol. Chem.*, 1909, **6**, 431-444.
- HEE (A.) et BAYLE (L.) : Recherches chimiques sur la germination. I. Evolution des substances grasses et du phosphore lipoidique du *Lupinus albus* au cours des premiers stades du développement. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1932, **14**, 758-782.
- HENRICI (M.) : Phosphormangel als Ursache von Störungen im Leben der Pflanze. *Verhandl. Naturf. Gesell. Basel.*, 1927, **38**, 316-326.
- HEUBNER (W.) et STADLER (H.) : Ueber eine Titrationmethode zur Bestimmung des Phytins. *Biochem. Z.*, 1914, **64**, 422-437.
- HEUBNER (W.) : Bestimmung anorganischer Phosphorsäure bei Gegenwart von Phosphorsäureestern, *Biochem. Z.*, 1914, **64**, 401-421.
- HILGER : Neues Vorkommen des Inosits im Pflanzenreiche und Ueberführung desselben in Paramilchsäure. *Ann. d. Chem. u. Pharm.*, 1871, **160**, 333.

- HINGLAIS (M.) : Contribution à l'étude de la répartition du phosphore dans les organes des vertébrés. *Th. Fac. Sc. Paris*, 1928.
- HOPPE-SEYLER (F.) : Ueber das Vitellin. Ichtin und ihre Beziehung zu den Eiweissstoffen. *Med.-chem. Unter.*, 1866, 215-220.
- HOPPE-SEYLER (F.) : Ueber Lecithin und Nuclein in der Bierhefe. *Z. Physiol. Chem.*, 1879, **2**, 427-429.
- HOWK (B. W.) et DE TURK (E. E.) : Ashing plant materials to determine total phosphorus. *Ind. Eng. Chem. Anal. Edit.*, 1932, **4**, 411-412.
- IWANOW (L.) : Ueber die Umwandlungen des Phosphors beim Keimen der Wicke. *Ber. d. deut. botan. Ges.*, 1902, **20**, 366-372.
- JAVILLIER (M.) et ALLAIRE (H.) : Sur le dosage du phosphore nucléique dans les tissus des animaux. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1925, **7**, 5.
- JAVILLIER (M.), ALLAIRE (H.) et GROG (M^{lle}) : L'analyse des poudres organo-thérapiques, leur teneur en phosphore total, lipidique et nucléique. *Bull. Sc. pharm.*, 1925, **32**, 644.
- JAVILLIER (M.) : Le phosphore nucléique des tissus et sa détermination quantitative. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1929, **11**, 644-678.
- JAVILLIER (M.) et ALLAIRE (H.) : Sur la technique de dosage du phosphore nucléo-protéidique. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1931, **13**, 678.
- JAVILLIER (M.) et COLIN (Y.) : Etudes sur le dosage des principes immédiats phosphorés des végétaux en vue de recherches de physiologie végétale. XIV^e Congresso internazionale di Fisiologia, Roma 1932; *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1933, **15**, 1552-1562.
- JAROSZ (W.) : Sur les composés phosphorés des plantes. IX. De l'hydrolyse des composés phytiques tirés des graines de chanvre, de fèves, de lin, de marrons d'Inde, de froment et d'embryons de seigle. *Bull. Ac. Polon. Sc. et Let.*, série B, 1933, 123-133.
- JENTYS (S.) : Der Gehalt der Körner und des Strohs des Hafers an phosphorsäure und ihren Verbindungen in seiner Abgängigkeit von der chemischen Beschaffenheit und Feuchtigkeit des Bodens. *Bull. Ac. Polon. Sc. et Let.*, série B, 1915, 180.
- JOHNSON et BROWN : The sugar contained in tuberculinic acid, the nucleic acid of tubercle Bacilli. *Journ. Am. Chem. Soc.*, 1923, **45**, 1823-1827.
- JOHNSON et COGHILL : The discovery of 5-methylcytosine in tuberculinic acid, the nucleic acid of the tubercle Bacillus. *Journ. Am. Chem. Soc.*, 1925, **47**, 2838-2844.
- JONES (W.) et FOLKOFF (C.) : *Bull. of the Johns Hopkins Hosp., Baltimore*, 1922, **33**, n° 382, 443-444; cité d'après *Ber. f. ges. Physiol.*, 1923, **18**, 428.
- JONES (W.) et GERMANN (H. C.) : Hydrolysis of yeast nucleic acid with ammonia. *Journ. biol. Chem.*, 1916, **25**, 93-102.
- JONES (W.) et PERKINS (M. E.) : The Nucleotides formed by the action of boiled pancreas on yeast nucleic acid. *Journ. biol. Chem.*, 1923, **55**, 557-565.
- JONES (W.) et READ (B. E.) : Adenil-Uracil Dinucleotide and the structure of yeast nucleic acid. *Journ. biol. Chem.*, 1917, **29**, 111-123.
- JONES (W.) et READ (B. E.) : Uracil-Cytosine Dinucleotide. *Journ. Biol. Chem.*, 1917, **31**, 39-45.
- JONES (W.) et RICHARDS (A. E.) : The partial enzymic hydrolysis of yeast nucleic acid. *Journ. Biol. Chem.*, 1914, **17**, 71-80.
- KARAPETOFF (H.) et SARACHNIKOFF (M.) : Sur la décomposition des matières protéiques dans les plantes. *Rev. gén. Botan.*, 1902, **14**, 483-486.

- KIA WO HOU : Contribution à l'étude de l'action des ferments de la graine de soja sur les lipides. *Th. Fac. Sc. Paris*, 1933.
- KINOSCHITA : On the consumption of Asparagine in the nutrition of Plants. *Bull. of Coll. of Agr. Tokyo*, 1895, **2**, n° 4.
- KNOWLES (F.) et WATKIN (J. E.) : The amounts and distribution of some phosphorus nitrogen compounds in wheat during growth. *Journ. Agr. Sc.*, 1932, **22**, 753-766.
- KOEHLER (S.) : Sur les composés phosphorés des plantes. I. La solubilité et la répartition des composés phosphorés contenus dans les semences. *Bull. intern. Ac. Polon. Sc. et Let.*, série B, 1926, 707-854.
- KOEHLER (S.) : Sur les composés phosphorés des plantes. II. De la solubilité des composés phosphorés des embryons de seigle. *Bull. intern. Ac. Polon. Sc. et Let.*, série B, 1929, 237.
- KOSSEL (A.) : Zur Chemie des Zellkerns. *Z. f. Physiol. Chem.*, 1882, **7**, 7.
- KOSSEL (A.) : Une longue série d'importants travaux publiés de 1879 à 1903 dans *Z. Physiol. Chem.* et *Arch. f. Anat. u. Physiol.*
- KUMAGAWA (M.) : Fettbestimmung nach Kumagawa-Suto. *Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden. Band IV, Erster Teil*, 1911, 477-488.
- KUMAGAWA (M.) et SUTO (K.) : Ein neues Verfahren zur quantitativen Bestimmung des Fettes und der unverseifbaren Substanzen in tierischem Material nebst der Kritik einiger gebräuchlichen Methoden. *Bioch. Z.*, 1908, **8**, 212-347.
- LANGE (J.) : Action de l'acide périodique sur les Polyalcools (réaction de Malaprade). *Th. Fac. Pharm. Paris*, 1933.
- LEBRETON (E.) : Sur la présence et le dosage dans le phosphore lipidique total éthéro-soluble de composés phosphorés autres que les phosphatides. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1921, **3**, 538-546.
- LECLERC DU SABLON : Sur la germination du ricin. *C. R. Ac. Sc.*, 1893, **117**, 524.
- LECLERC DU SABLON : Sur la germination des graines oléagineuses. *C. R. Ac. Sc.*, 1894, **119**, 610.
- LECLERC DU SABLON : Sur la germination des amandes. *Rev. gén. Bot.*, 1897, **9**, 5.
- LEMELAND (P.) : Recherches chimiques et physiologiques sur les matières grasses et les lipoides du sang. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1921, **3**, 134-169.
- LEMELAND (P.) : Observations sur le dosage du phosphore lipoidique total dans les tissus. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1922, **4**, 119.
- LEMELAND (P.) : Etude critique de la méthode de Kumagawa-Suto. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1922, **4**, 300.
- LEMELAND (P.) : Observations sur le dosage du phosphore lipoidique total dans les tissus. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1923, **5**, 110.
- LEVENE (P. A.) : Une longue série d'importants travaux avec Bass, Jacobs, La Forge, Medigreceanu, Simms, Sobotka, etc. dans *Z. Physiol. Chem.*, de 1903 à 1905 ; *Ber. d. deut. Chem. Gesell.*, de 1908 à 1912 ; *Biochem. Z.*, de 1908 à 1910 ; *Journ. Biol. Chem.*, depuis 1914.
- LEVENE (P. A.) : Ueber die Hefenucleinsäure. *Biochem. Z.*, 1909, **17**, 120.
- LEVENE (P. A.) : On the structure of thymus nucleic acid and on its possible bearing on the structure of plant nucleic acid. *Journ. Biol. Chem.*, 1921, **48**, 119-125.
- LEVENE (P. A.) : Structure and significance of the phosphatides. *Physiol. R.*, 1921, **1**, 327-393.

- LEVENE (P. A.) et JACOBS (W. A.) : Ueber die Hefe-Nucleinsäure. *Ber. d. deut. Chem. Gesell.*, 1909, **42**, 2474.
- LEVENE (P. A.) et LA FORGE (F. B.) : Ueber die Tritico-nucleinsäure. *Ber. d. deut. Chem. Gesell.*, 1910, **43**, 3164.
- LEVENE (P. A.) : Structure of yeast nucleic acid. Ammonia hydrolysis. *Journ. Biol. Chem.*, 1920, **41**, 19.
- LEVENE (P. A.) et ROLF (I. P.) : Plant phosphatides. I. Lecithin and cephalin of the soy bean. *Journ. Biol. Chem.*, 1924, **62**, 750.
- LEVENE (P. A.) et ROLF (I. P.) : Bromolecithins : Fractionation of brominated soy bean lecithins. *Journ. Biol. Chem.*, 1925, **65**, 545.
- LEVENE et ROLF (I. P.) : Plant phosphatides : Lecithin, cephalin and so-called cuorin of the soy bean. *Journ. Biol. Chem.*, 1926, **68**, 285.
- LEWONIEWSKA (S.) : Schwankungen in dem Gehalte der Pflanzensamen an einzelnen Phosphorsäureverbindungen in ihrer Abhängigkeit von Vegetationsbedingungen. *Bull. int. Ac. Polon. Sc. et Let.*, série B, 1911, 85-96.
- LEYMARIE (J.) : Sur un procédé pratique de dosage de l'humidité dans les produits pharmaceutiques et alimentaires. *Th. Fac. Pharm. Paris*, 1934.
- LINDENBAUM (S.) : Sur les composés phosphorés des plantes. III. Sur la solubilité des composés phosphorés de la farine d'avoine et sur la faculté de l'acide phytique de se combiner avec les substances protéiques qu'elle contient. *Bull. int. Ac. Polon. Sc. et Let.*, série B, 1926, 1041.
- LINDENFELD (K.) : Ueber die Bestimmung von anorganischer und Phytinphosphorsäure in Phytinpräparaten. *Biochem. Z.*, 1933, **257**, 8-13.
- MAC COLLUM (E. V.) et HART (E. B.) : Ueber des Vorkommen eines phytinspaltenden Enzyms in animalischen Geweben. *Chem. Ztg.*, 1908, **32**, 410.
- MAC LEAN : On the purification of phosphatides. *Biochem. J.*, 1912, **6**, 353.
- MALINIAK (M.) : Recherches sur la formation des matières protéiques à l'obscurité dans les végétaux inférieurs. *Rev. gén. Bot.*, 1900, **12**, 337.
- MANCEAU (P.), REVOL (L.), CHARMILLON (R.) : Variations du phosphore étherosoluble au cours de la maturation et de la germination des graines de marron d'Inde. *C. R. Soc. Biol.*, 1932, **110**, 850.
- MAQUENNE : Préparation, propriétés et constitution de l'inosite. *C. R. Ac. Sc.*, 1853, **104**, 225.
- MAQUENNE : Sur les changements de composition qu'éprouvent les graines oléagineuses au cours de la germination. *C. R. Ac. Sc.*, 1898, **127**, 625.
- MARME (W.) : Ein Beitrag zum Vorkommen des Inosits, *Ann. d. Chem. u. Pharm.*, 1864, **129**, 222.
- MAROTTA (D.) et CALO (A.) : *Ann. Chim. applicata*, 1932, **22**, 763-776.
- MASCHKE : Pigmentlösung als Reagenz bei mikroskopisch-physiologischen Untersuchungen, *Botan. Ztg.*, 1859, **3**, 21.
- MAXWELL (W.) : On the behaviour of fatty bodies and the role of the lecithins during normal germination. *Amer. Chem. Journ.*, 1891, **13**, 16-24.
- MENGDEHL : Die Bestimmung von Pyro- und Metaphosphat, sowie von Phosphit und Hypophosphit in Pflanzenmaterial. *Planta*, 1933, **19**, 154.

- MERLIS (M.) : Ueber die Zusammensetzung der Samen und der etiolierten keimpflanzen von *Lupinus angustifolius* L. *Landwirt. Versuchsstat.*, 1897, **48**, 449-454.
- MIESCHER : Ueber die chemische Zusammensetzung der Eiterzellen. *Hoppe-Seylers Med. Chem. Unters.*, 1871, 441.
- MILLER (E. C.) : A physiological study of the germination of *Helianthus annuus*. *Ann. of Bot.*, 1910, **24**, 693-726.
- MINKOWSKA (S.) : Sur les composés phosphorés des plantes. VI. De la solubilité des composés phosphorés de la farine d'orge. *Bull. int. Ac. Pol. Sc. et Let. B.*, 1926, 1007.
- MNICH (E.) : Sur les composés phosphorés des plantes. VI. Sur la solubilité des composés phosphorés de la farine de féverole et sur la faculté de la phytine de se combiner avec les substances protéiques qu'elle contient. *Bull. int. Ac. Pol. Sc. et Let. B.*, 1931, 123.
- NEUBAUER (C.) : Beiträge zur qualitativen Analyse des Weinlaubs, *Landwirt. Versuchsstat.*, 1873, **16**, 427.
- NEUBERG (C.) : Zur Frage der Konstitution des « Phytins ». *Biochem. Z.*, 1908, **9**, 557.
- NEUBERG (C.) : Ueberführung der Fructose-diphosphorsäure in Fructose-monophosphorsäure. *Biochem. Z.*, 1918, **88**, 432-436.
- NEUBERG et BRAHN (B.) : Ueber die Inosinsäure. *Biochem. Z.*, 1907, **5**, 443.
- NEUBERG et KRETSCHMER (E.) : Weiteres über künstliche Darstellung von Kohlenhydratphosphorsäureestern und Glycerinphosphorsäure. *Biochem. Z.*, 1914, **36**, 5-14.
- NOTTBOHM et MAYER : Unterscheidung von Lecithin-Präparaten tierischer und pflanzlicher Herkunft. *Chem. Ztg.*, 1932, **89**, 881.
- OSBORNE (T. B.) : Ein hydrolytisches Derivat des Globulins, Edestin, und sein Verhältniss zum Weyl's Albuminat und zur Histongruppe. *Z. physiol. Chem.*, 1904, **33**, 225-239.
- OSBORNE (T. B.) : A hydrolytic Derivative of the Globulin Edestin and its Relation to Weyl's Albuminate and the histon group. *Journ. Amer. Chem. Soc.*, 1902, **24**, 28-39.
- OSBORNE et HARRIS (I. F.) : Die Nucleinsäure des Weizenembryos. *Z. physiol. Chem.*, 1902, **36**, 85-133.
- OSBORNE (T. D.) et STRAUSS (E.) : Einfache Eiweisstoffe, Proteine. A. Darstellung der Proteine der Pflanzenwelt. *Abderhalden. Handbuch d. biolog. Arbeitsmethod. Abt. I. Theil* 8, Lief. 39.
- PALLADINE (W.) : Beiträge zur Kenntniss der pflanzlichen Eiweisstoffe. *Z. f. Biologie*, 1895, **13**, 191 (N. F.).
- PALLADINE (W.) : Influence de la lumière sur la formation des substances vivantes dans les tissus de végétaux. *C. R. Ac. Sc.*, 1899, **128**, 377.
- PARROZZANI (A.) : *Staz. sperim. agrar. ital.*, 1908, **41**, 729; extr. dans *Biederm. Ztrbl.*, 1909 **38**, 612.
- PFEFFER : Untersuchungen über die Proteinkörner. *Pringsheim's Jahrbuch. f. wiss. Botan.*, 1872, **8**, 429 et 475.
- PISCHINGER (E.) : Sur les composés phosphorés des plantes. VII. Sur la solubilité des composés phosphorés du chénevis. *Bull. int. Ac. Pol. Sc. et Let. B.*, 1932, 37-50.
- PLIMMER et SCOTT : A reaction distinguishing phosphoprotein from nucleoprotein and the distribution of phosphoproteins in tissues. *Journ. Chem. Soc. London*, 1908, II, **93**, 1699.

- POSTERNAK (S.) : Contribution à l'étude chimique de l'assimilation chlorophyllienne. Sur le premier produit d'organisation de l'acide phosphorique dans les plantes à chlorophylle, avec quelques remarques sur le rôle physiologique de l'inosite. *Rev. gén. Bot.*, 1900, **12**, 5-24 et 65-73.
- POSTERNAK (S.) : Sur la matière phospho-organique de réserve des plantes à chlorophylle. Procédé de préparation. *C. R. Ac. Sc.*, 1903, **137**, 202.
- POSTERNAK (S.) : Sur les propriétés et la composition chimique de la matière phosphorique de réserve des plantes à chlorophylle. *C. R. Ac. Sc.*, 1903, **137**, 337.
- POSTERNAK (S.) : Sur la constitution de l'acide phospho-organique de réserve des plantes vertes et sur le premier produit de réduction du gaz carbonique dans l'acte de l'assimilation chlorophyllienne. *C. R. Ac. Sc.*, 1903, **138**.
- POSTERNAK (S.) : Sur deux sels cristallisés du principe phospho-organique de réserve des plantes vertes. *C. R. Ac. Sc.*, 1919, **168**, 1216.
- POSTERNAK (S.) : Sur la constitution du principe phospho-organique de réserve des plantes vertes. *C. R. Ac. Sc.*, 1919, **169**, 337.
- POSTERNAK (S.) : Sur la synthèse de l'éther hexaphosphorique de l'inosite et son identité avec le principe phospho-organique de réserve des plantes vertes. *C. R. Ac. Sc.*, 1919, **169**, 79.
- POSTERNAK (S.) : A propos du sel de soude saturé de l'inosite hexaphosphorique. *C. R. Ac. Sc.*, 1919, **169**, 337.
- POSTERNAK (S.) : Sur le noyau phosphoré de la caséine. *C. R. Ac. Sc.*, 1927, **184**, 307.
- POSTERNAK (S. et Th.) : Sur le noyau phosphoré de l'ovovitelline. *C. R. Ac. Sc.*, 1927, **185**, 615.
- POSTERNAK (S. et Th.) : Sur un éther inosito-tétraphosphorique naturel optiquement actif. *C. R. Ac. Sc.*, 1928, **186**, 261.
- POSTERNAK (Th.) : Sur le mode de liaison du phosphore et du fer dans l'ovovitelline. *Thèse Sc. Genève*, 1928.
- POSTERNAK (S. et Th.) : Sur la configuration de l'inosite inactive. *C. R. Ac. Sc.*, 1929, **188**, 1926 ; *Helv. Chim. Acta*, 1929, **12**.
- POSTERNAK (Th.) : Sur le phosphore de la fécule de pomme de terre. *C. R. Ac. Sc.*, 1933, **197**, 1157.
- PRIANISCHNIKOFF (N.) : Eiweisszerfall u. Eiweissrückbildung in den Pflanzen. *Vort. Mittheil. deut. botan. Gesell.*, 1899, **17**, 151.
- RATHER (J. B.) : Phytic acid in cottonseed meal and wheat bran. *Journ. Amer. Chem. Soc.*, 1913, **35**, 890.
- RATHER (J. B.) : The nature of the inosite phosphoric acids of some important feeding materials. *Journ. Amer. Chem. Soc.*, 1918, **40**, 523-37.
- RATHER (J. B.) : The inosite phosphoric acid of cottonseed meal. *Journ. Amer. Chem. Soc.*, 1917, **39**, 777.
- RATHER (J. B.) : The determination of phytin phosphorus in plant products. *Journ. Amer. Chem. Soc.*, 1917, **39**, 2506-2515.
- REINKE : *Unters. d. bot. Lab. Göttingen*, 1881, **2**, 54.
- RENGNIEZ : De l'acide phosphorique dans les principales farines alimentaires, *Th. Pharm. Paris*, 1911.
- REYNOLDS, GREEN (J.) et JACKSON (H.) : Further observations on the germination on the seeds of the Castor-Oil Plant (*Ricinus communis*). *Proc. Roy. Soc. London B*, 1906, **77**, 69-85.

- REWALD : Die Verteilung der Phosphatide in den Samen und den Keimpflanzen. *Biochem. Z.*, 1929, **216**, 15-18.
- RITTHAUSEN (H.) : Ueber die Zusammensetzung des Vicins. *Journ. Prakt. Chem.*, 1899, **59**, 480-487.
- ROBISON (R.) : A new phosphoric ester produced by the action of yeast juice on hexoses. *Biochem. J.*, 1922, **16**, 809-824.
- ROGOZINSKI (F.) : Beiträge zur Biochemie des Phosphors. *Bull. int. Act. Pol. Sc. et Let. B.*, 1915, 87-98.
- RUPPEL (W. G.) : Zur Chemie des Tuberkelbacillen. *Z. physiol. Chem.*, 1898, **26**, 218-232.
- SACHSSE : Ueber die Proteinkrystalloide von *Bertholletia excelsa*. *Sitzungsber. d. naturf. Gesell. Leipzig*, 1876, 23.
- SCHULZE (E.) : Ueber die zur Darstellung von Lecithin und anderen Phosphatiden aus Pflanzensamen verwendbaren Methoden. *Z. physiol. Chem.*, 1908, **55**, 338.
- SCHULZE et BOSSHARD (E.) : Zur Kenntniss des Vorkommens von Allantoin, Asparagin, Hypoxanthin und Guanin in den Pflanzen. *Z. physiol. Chem.*, 1885, **9**, 420-444.
- SCHULZE et CASTORO (N.) : Findet man in Pflanzensamen und in Keimpflanzen anorganische Phosphate? *Z. physiol. Chem.*, 1904, **41**, 477-84.
- SCHULZE et WINTERSTEIN (E.) : Ueber einen phosphorhaltigen Bestandtheil der Pflanzensamen. *Z. physiol. Chem.*, 1896, **22**, 91.
- SEIDLER (L.) : Untersuchungen über den Umsatz der Phosphorsäure im Pflanzenorganismus in verschiedenen Vegetationsstadien und bei verschiedenen Phosphorsäuredüngungen. *Landwirt. Versuchsstat.*, 1913, 79-80 et 563.
- SLADE : *Amer. Journ. Physiol.*, 1905, **13**, 464.
- STANISKIS (W.) : Beiträge zur Kenntniss des Umsatzes von P_2O_5 im Pflanzenorganismus. *Bull. int. Ac. Pol. Sc. et Let. B.*, 1909, 95-123.
- STUTZER (A. H.) : Untersuchungen über den Gehalt vegetabilischer Stoffe an Stickstoff. Phosphor und Schwefel in organischer Bindung. *Biochem. Z.*, 1908, **7**, 470-487.
- SUZUKI, YOSHIMURA et TARAISHI : Ueber ein Enzym « Phytase » das « Anhydrooxymethyldiphosphorsäure » spaltet. *B. Coll. Agr. Tokyo*, **7**, 495. *Résumé Chem. Ztrbl.*, 1907, **2**, 1636.
- TANRET et VILLIERS : Recherches sur l'inosine. *Ann. Chim. Phys.*, (5), 1884, **23**, 387-97.
- TANRET et VILLIERS : Sur une matière sucrée retirée des feuilles de noyer. *C. R. Ac. Sc.*, 1877, **84**, 393.
- TERROINE : État actuel de nos connaissances sur la formation des graisses. *Ann. Sc. nat. bot.*, (10), 1920, **2**, 1.
- THANNHAUSER (S. J.) : Verdauung der Hefenucleinsäure durch menschlichen Duodenalsaft. Isolierung der Triphosphonucleinsäure. *Z. physiol. Chem.*, 1914, **91**, 329-335.
- THANNHAUSER (S. J.) et DOREMULLER (G.) : Ueber den Aufbau des Hefenucleinsäuremoleküles und seine gleichartige Aufspaltung durch milde, ammoniakalische und fermentative Hydrolyse. *Z. physiol. Chem.*, 1917, **100**, 121-147.
- THOMAS (P.) : Recherches biochimiques sur les protéides de la levure. *Th. Fac. Sc. Paris*, 1919.

- TRÖPF (M. Y.) et SOLTZ (L. M.) : Determination of phytin and calcium glycerophosphate. *Farm. Zhur. russe*, 1932, 11-12, 332-333.
- ULRICH (H.) : Ueber erschöpfende Extraction von Alkohol und wasserlöslichen Phosphorverbindungen aus Pflanzenteilen. *Arch. Experim. Pathol. u. Pharmacol.*, 1912, **68**, 171-182.
- VAN HERWERDEN : Ueber die Nuclease als Reagens auf Nukleinsäureverbindungen der Zelle. *Anal. Anz.*, 1914. Cité par Guilliermond et Mangenot, *Rev. gén. Bot.*, 1927, **39**, 797.
- VOHL (H.) : Ueber den Phaseomannit und seine Identität mit dem Inosit. *Ann. d. Chem. u. Pharm.*, 1837, **101**, 50.
- VORBRÖDT (W.) : Untersuchungen über die Phosphorverbindungen in den Pflanzensamen, mit besonderer Berücksichtigung des Phytins. *Bull. int. Ac. Pol. Sc. et Let. B.*, 1910, 414.
- WEBSTER (J. E.) : Phosphorus distribution in grains. *Journ. Agric. Research.*, 1928, **37**, 123-125.
- WIAZOWNICKA (H.) : La solubilité des composés phosphorés de la farine de froment et la faculté de la phytine de se combiner avec les substances protéiques qu'elle contient. *Bull. int. Ac. pol. Sc. et Let. B.*, 1933, 107-122.
- WINTERSTEIN (E.) : Ueber einen phosphorhaltigen Pflanzenbestandteil, welcher bei der Spaltung Inosit liefert. *Ber.*, 1897, **30**, 2299.
- WINTERSTEIN (E.) : Beiträge zur Kenntnis pflanzlicher Phosphatide. *Z. physiol., Chem.*, 1908, **58**, 500.
- YOUNG (W. J.) : Ueber die Zusammensetzung der durch Hefepresssaft gebildeten Hexosephosphorsäure. *Bioch. Z.*, 1911, **32**, 178-188.
- ZALESKI (W.) : Zur Kenntnis der Zurebel von *Allium cepa* und Eiweissbildung. *Vorl. Mitth. Ber. deut. bot. Gesell.*, 1898, **16**, 146.
- ZALESKI (W.) : Les transformations et le rôle des composés phosphorés dans les plantes. *Kharkof*, 1911.
- ZICKES : Beitrag zum Volutin-Vorkommen in Pilzen. *Centr. f. Bakt. 2 Abteilung*, 1922, **57**, 21.
- ZLATAROFF (A.) : Phytobiochemische Studien. *Biochem. Z.*, 1916, **75**, 200-210.

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

LES MODIFICATIONS DES ÉLIMINATIONS URINAIRES SOUS L'INFLUENCE DU
TRAVAIL MUSCULAIRE.

VU :

Le Président de Thèse,
M. JAVILLIER.

VU ET APPROUVÉ :

Le Doyen de la Faculté des Sciences,
CH. MAURAIN.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Le Recteur de l'Académie de Paris,
S. CHARLÉTY.



31039. — A. MARETHEUX et L. PACTAT, imp., 1, rue Cassette, Paris. — 1935.
